

# **Hmotnostní spektrometrie....**

**...co to umí?**

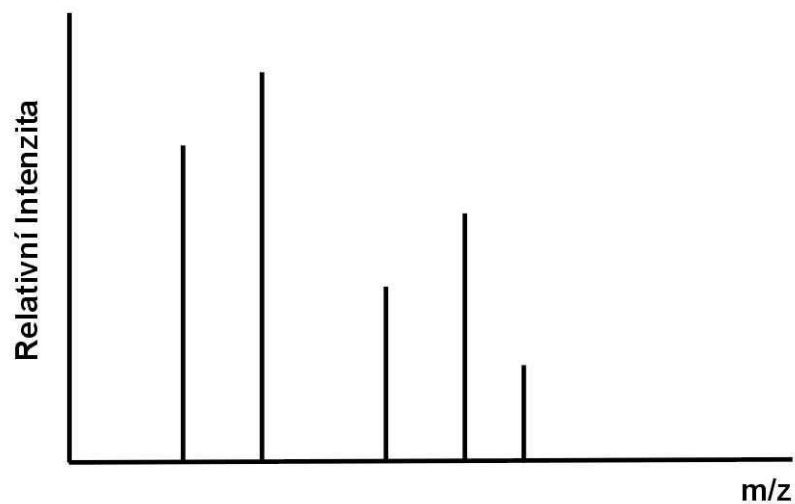
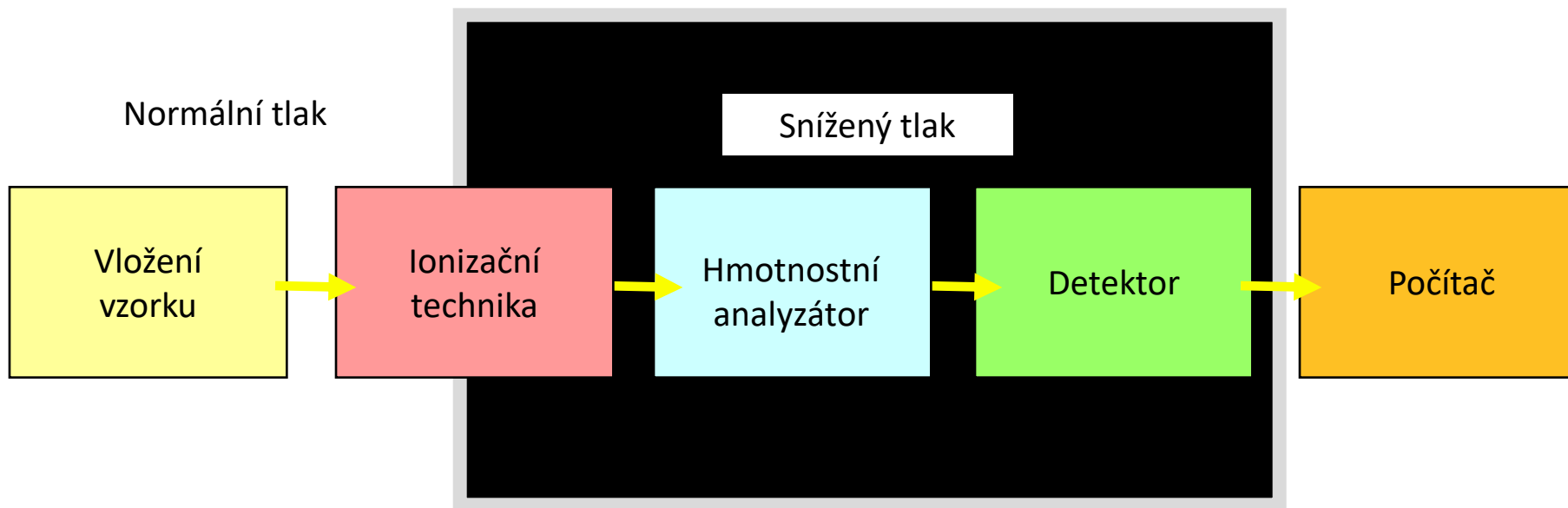
**Měřit přesnou molekulovou hmotnost**

**Určovat izotopové zastoupení**

**Napomáhat určení struktury**

**Provádět kvantitativní měření**

# Hmotnostní spektrometr



# Ionizační techniky.

Převod z tuhé/kapalné/plynné fáze do plynné a tvorba iontů

měkké X tvrdé

vakuum X atmosferický tlak (ambientní ionizace) – API

Negativní X pozitivní mód

Měkké ionizační techniky – hlavně pseudomolekulární ionty – přidání/odtržení protonu  $M+H^+$  /  $M-H^+$  - také nabití pomocí kationtů ( $Na^+$ ,  $K^+$ , ... či aniontů v negativním iontovém módu)

*Tvorba aduktů – solvent, matrice, nečistoty, sám se sebou,...*

# Ionizační techniky.

## ESI – Electrospray Ionization

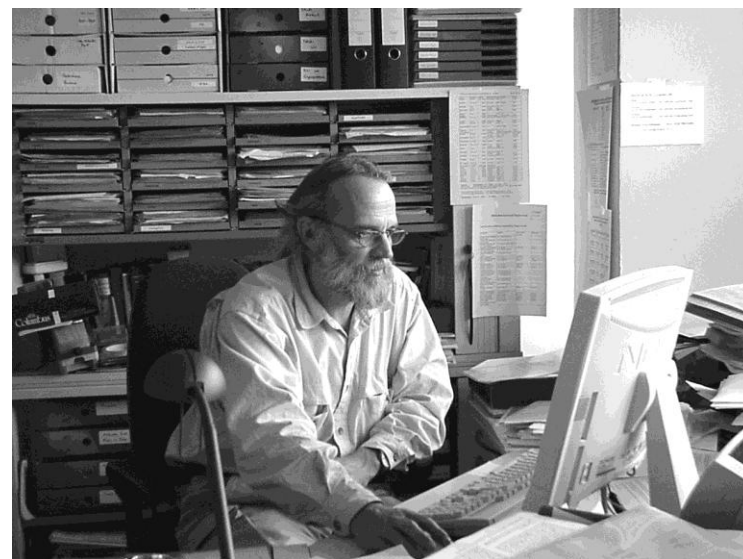
- DESI – Desorption Electrospray Ionization
- nESI – nano ESI
- paper spray

## MALDI – Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

- LDI – Laser Desorption/Ionization
- NALDI – Nano Assisted Laser Desorption/Ionization  
(Nanostructured / Nanowire)
- DIOS - Desorption Ionization On Silicon
- SELDI – Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization
  - SEND – surface enhanced neat desorption (DIOS)
  - SEPAR – surface enhanced photolabile attachment and release
  - SEAC – surface enhanced affinity capture

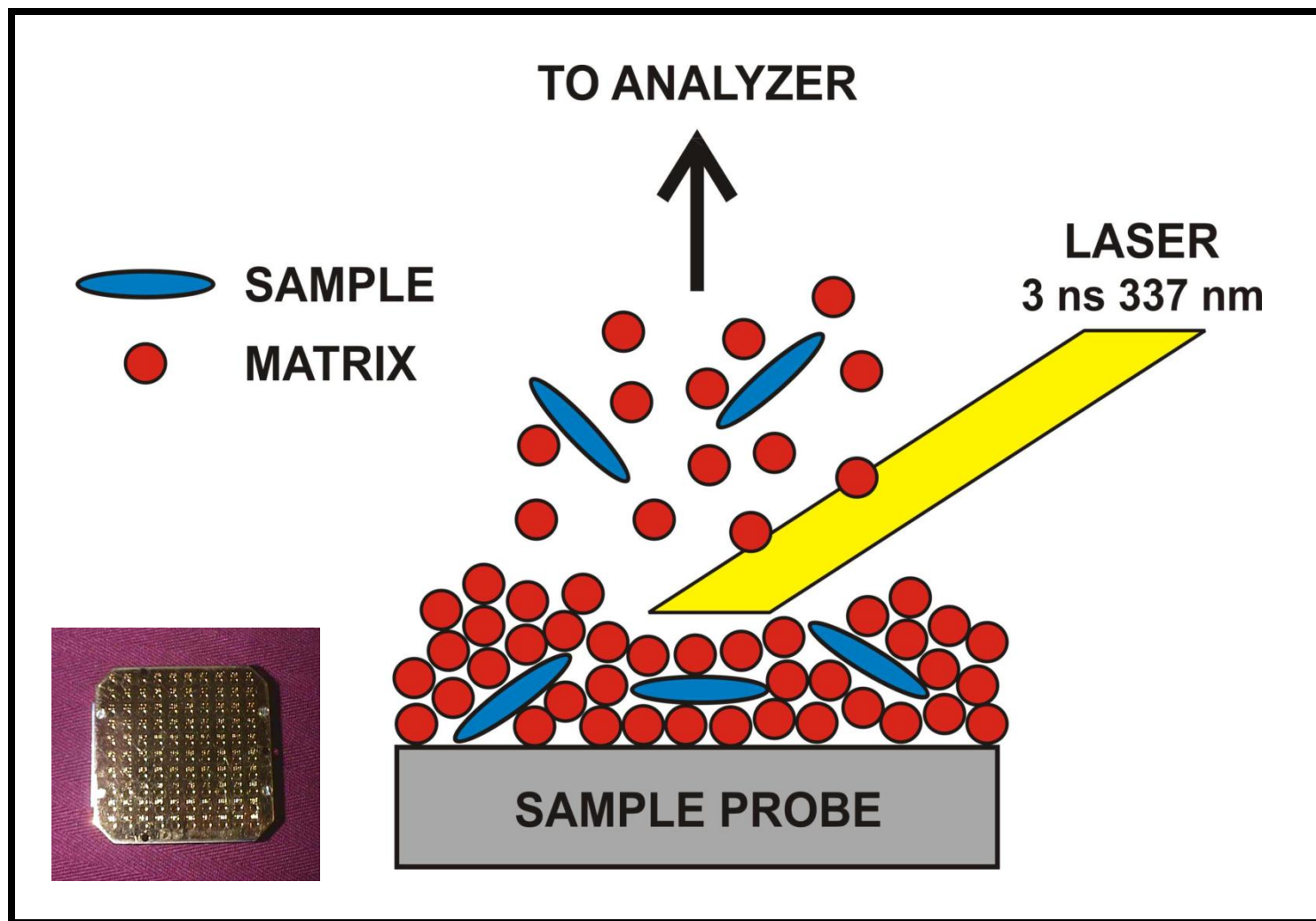
# Desorpce laserem za přítomnosti matrice

## K. Tanaka / M. Karas, F. Hillenkamp



Karas M; Bachmann D; Bahr U; Hillenkamp F: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987, 78, 53.  
Tanaka K; Waki H; Ido Y; Akita S; Yoshida Y; Yoshida T: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988, 2, 151.

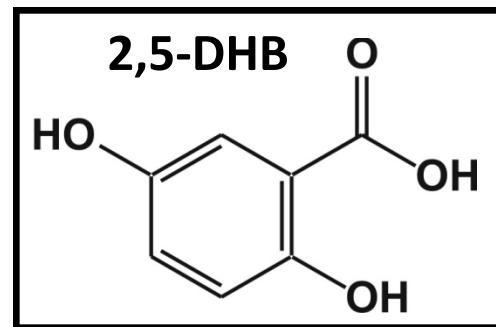
# MALDI Ionizační proces



# MALDI Ionizační proces

## MALDI matrice

dobrá absorpce za použité vlnové délky  
stabilita ve vakuu, netěkavá  
přenos protonu



vzorek : matrice = 1 :  $10^4$ - $10^5$

mísitelné se vzorkem v tuhé fázi

solventy: MeOH, EtOH, MeCN, H<sub>2</sub>O, THF, aceton ...

## UV-MALDI

337 nm dusíkový laser

355 nm Nd:YAG

266 nm Nd:YAG

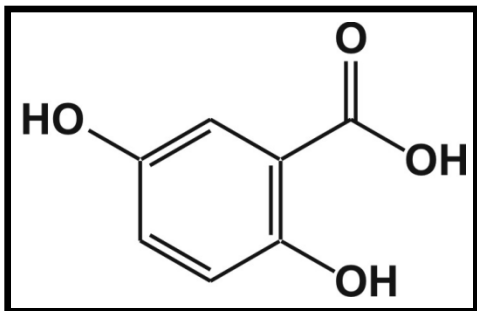
193 nm ArF

## IR-MALDI

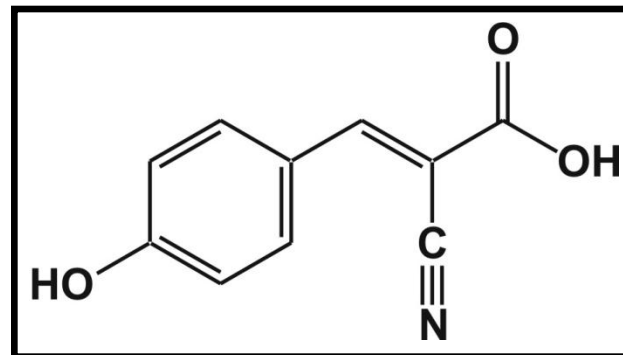
2.94  $\mu$ m Er:YAG laser

10.6  $\mu$ m CO<sub>2</sub> laser

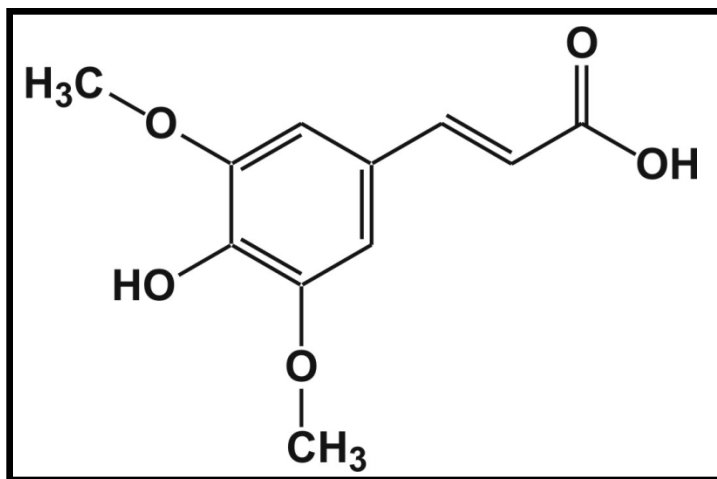
# MALDI matrice



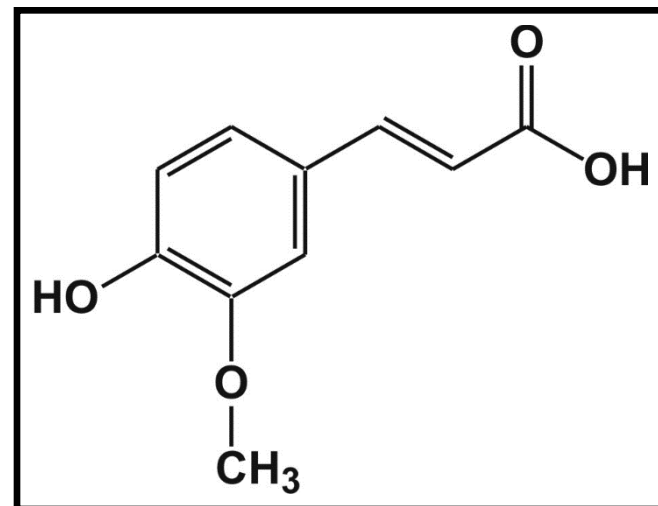
kys. 2,5-dihydroxybenzoová (DHB)



kys.  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA)



kys. sinapová (SA)  
(kys. 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová)



kys. ferulová (FA)  
(kys. 4-hydroxy-3-methoxyskořicová)

# MALDI Ionizační proces

- Měkká ionizace
- Malá nebo žádná fragmentace, jednoduchá interpretace
- Jednonásobně nabité ionty  $[M+H]^+$ ;  $[M-H]^-$
- Rychlá a jednoduchá příprava
- Proteiny, peptidy, oligosacharidy, nukleotidy  
syntetické polymery ...
- Tolerantní k detergentům, solím...
- Krátké laserové pulsy;  $t \sim \text{ns}$
- Nejčastěji spojeno s TOF analyzátozem

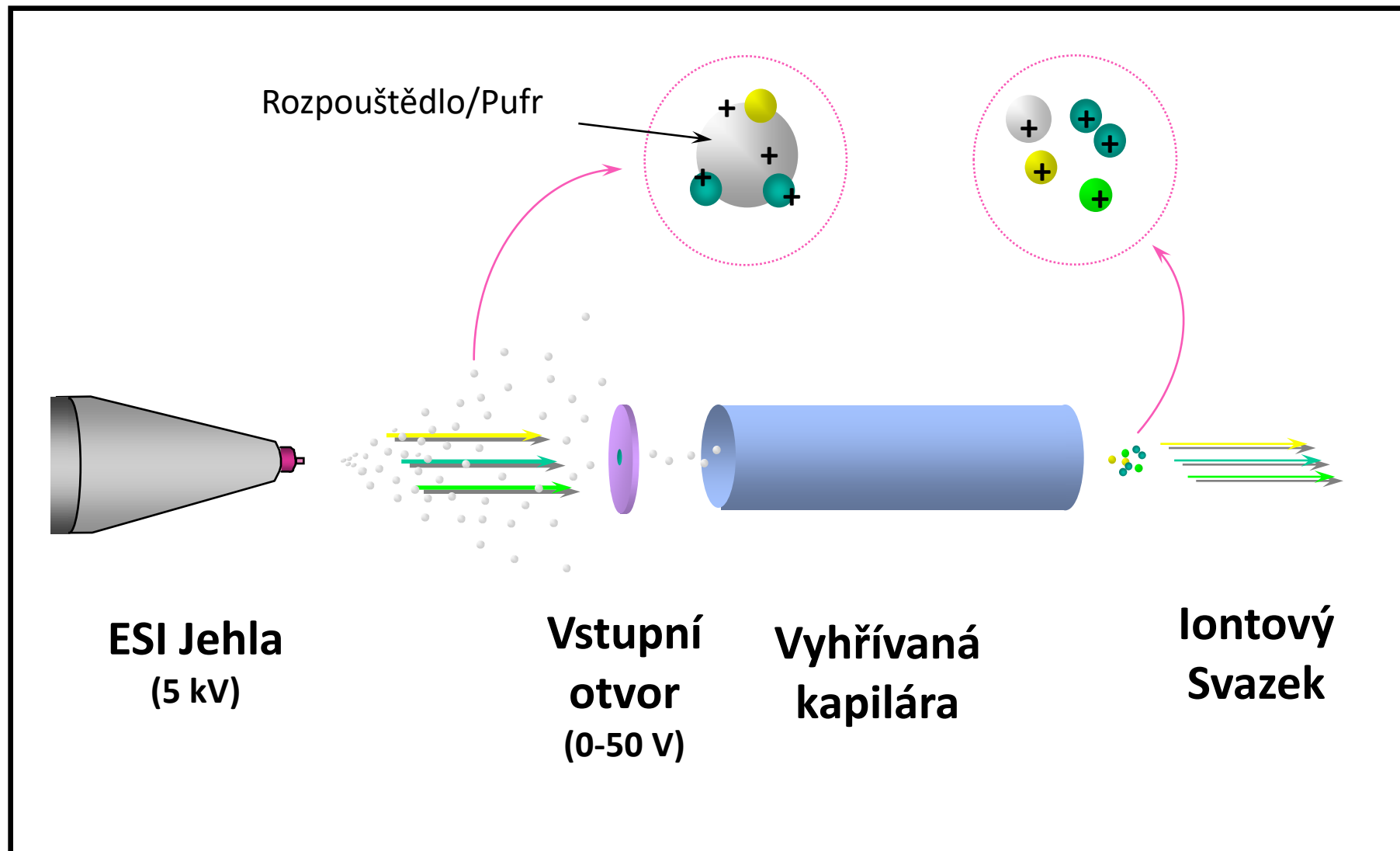
# Elektrosprej – J. B. Fenn



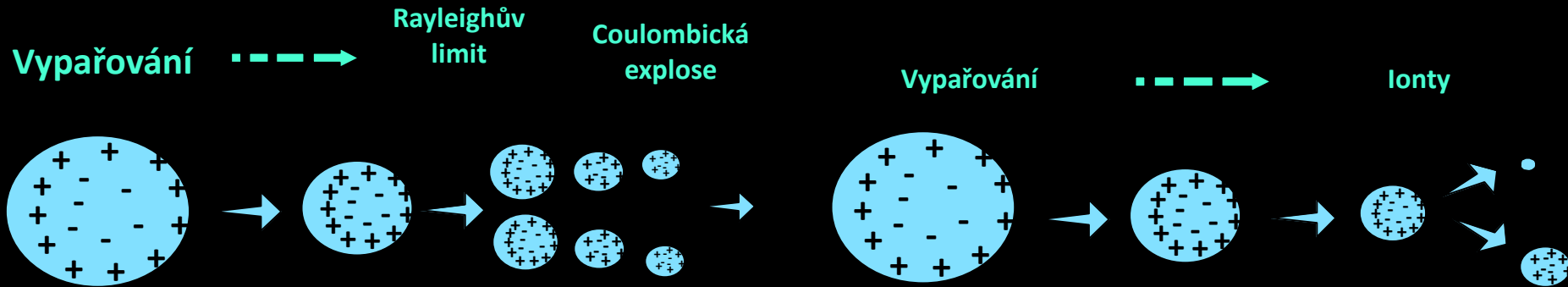
1994 – nanoelektrosprej –  
M. Mann a M. Wilm

Fenn JB; Mann M; Meng CK; Wong SF; Whitehouse CM: *Science* 1989, 246, 64.

# Ionizace elektrospejem



# Princip ionizace elektrosprejem



<http://www.youtube.com/watch?v=palklu1-ChA>

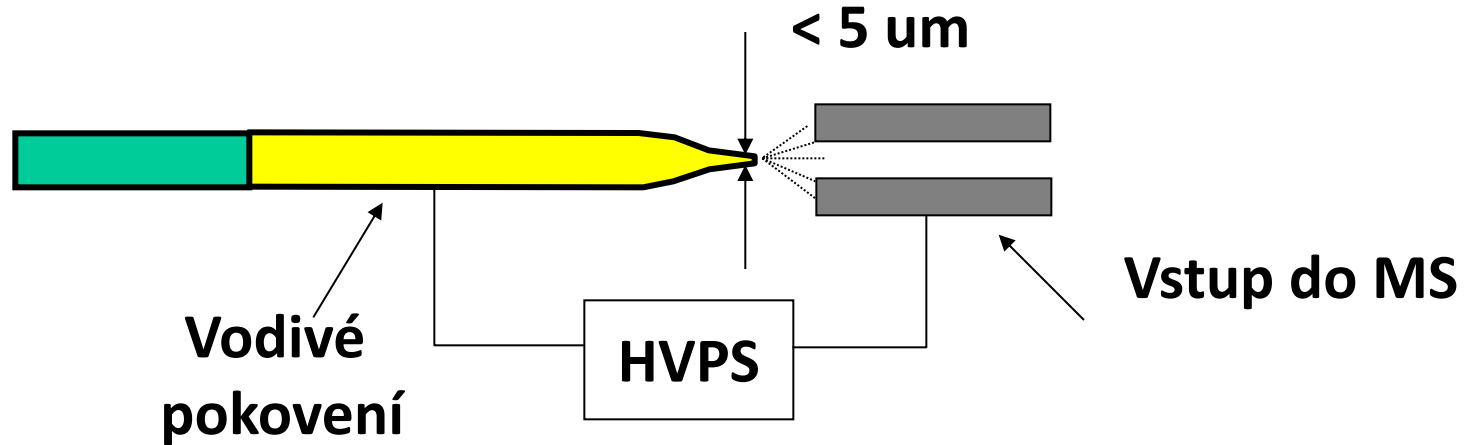


<http://www.youtube.com/watch?v=YukX2s1kuYc>

# Ionizace elektrosprejem

- **Velmi měkká ionizace**
- **Mnohonásobně nabité ionty – 1, 2, 3, ...60x**
- **Malá nebo téměř žádná fragmentace**
- **proteiny, peptidy, oligosacharidy, nukleotidy, syntetické polymery ...**
- **Nekovalentní komplexy (proteinové komplexy, komplexy protein-ligand, atd.)**
- **Vysoká náročnost na čistotu**
- **Napojitelné na LC**

# Nanospray - nESI



**Křemenná kapilára vytažená/zbroušená do špičky (<  $\mu\text{m}$ )**

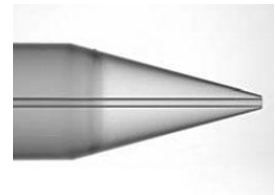
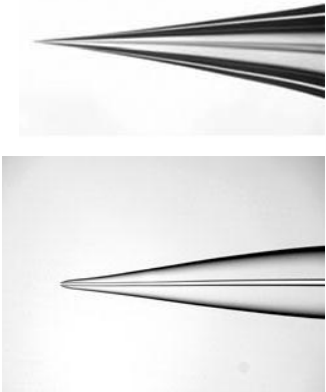
**Velmi malé kapky < 200 nm**

**Průtoky v řádu 25 nl/min**

**Mnohem vyšší účinnost ionizace**

**Miniaturní spotřeby vzorku**

**Větší tolerance k solím**



# Analyzátory

statické - dynamické

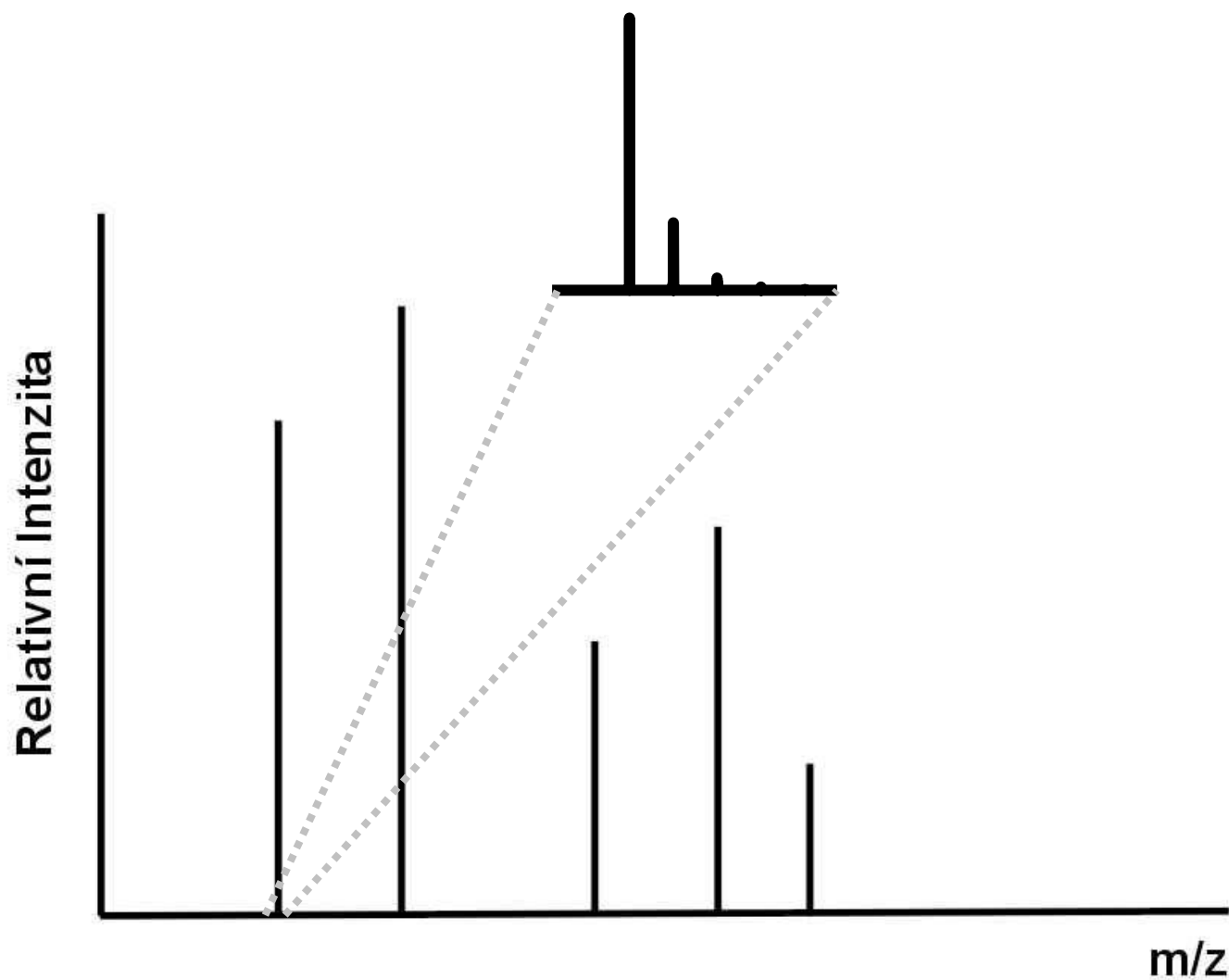
Typ

separace

|                                                    |       |                           |
|----------------------------------------------------|-------|---------------------------|
| Magnetický sektor                                  | (B)   | magnetický moment         |
| Elektrický sektor                                  | (E)   | kinetická energie         |
| Kvadrupól                                          | (q)   | m/z stabilita trajektorie |
| Iontová past<br>(kvadrupólová-sférická / lineární) | (IT)  | m/z rezonanční frekvence  |
| Průletový                                          | (ToF) | doba letu                 |
| Cyklotronová rezonance (ICR)                       |       | m/z rezonanční frekvence  |
| Orbitální past                                     | (OT)  | m/z rezonanční frekvence  |

... a hybridy (qTOF, TOFTOF, QqQ, Q-FT-ICR, IIT-OT, etc.)

# Bližší pohled na MS spektrum



# Atomové hmotnosti

| Symbol | M <sub>nom</sub> | M <sub>mono</sub> | %        |
|--------|------------------|-------------------|----------|
| C      | 12               | 12.00000          | 98.9300  |
|        | 13               | 13.00336          | 1.0700   |
| H      | 1                | 1.00783           | 99.9885  |
|        | 2                | 2.01411           | 0.1150   |
| N      | 14               | 14.00307          | 99.6320  |
|        | 15               | 15.00011          | 0.3680   |
| O      | 16               | 15.99492          | 99.7570  |
|        | 17               | 16.99913          | 0.0380   |
|        | 18               | 17.99916          | 0.2050   |
| S      | 32               | 31.97207          | 94.9300  |
|        | 33               | 32.97146          | 0.7600   |
|        | 34               | 33.96787          | 4.2900   |
|        | 36               | 35.96708          | 0.0200   |
| P      | 31               | 30.97376          | 100.0000 |

# Přítomnost izotopů ( $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{18}\text{O}$ , ...) se projeví na tvaru píku.

$^{12}\text{C}$   
 $^1\text{H}$   
 $^{14}\text{N}$   
 $^{16}\text{O}$   
 $^{32}\text{S}$

$2 \times ^{13}\text{C}$

$2 \times ^2\text{H}$

$2 \times ^{15}\text{N}$

$2 \times ^{17}\text{O}$

$2 \times ^{33}\text{S}$

$1 \times ^{34}\text{S}$

$1 \times ^{18}\text{O}$

$1 \times ^{13}\text{C} + 1 \times ^2\text{H}$

$1 \times ^{13}\text{C} + 1 \times ^{15}\text{N}$

$1 \times ^{13}\text{C} + 1 \times ^{17}\text{O}$

$1 \times ^{13}\text{C} + 1 \times ^{33}\text{S}$

$1 \times ^2\text{H} + 1 \times ^{15}\text{N}$

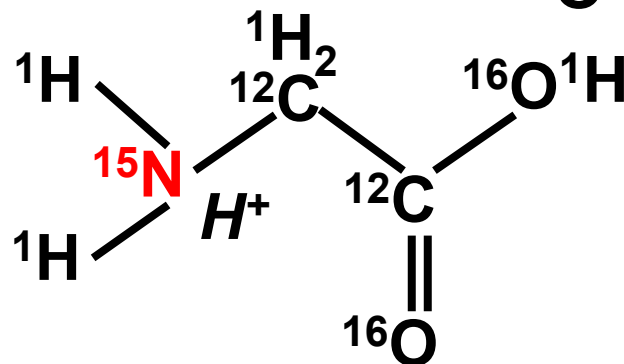
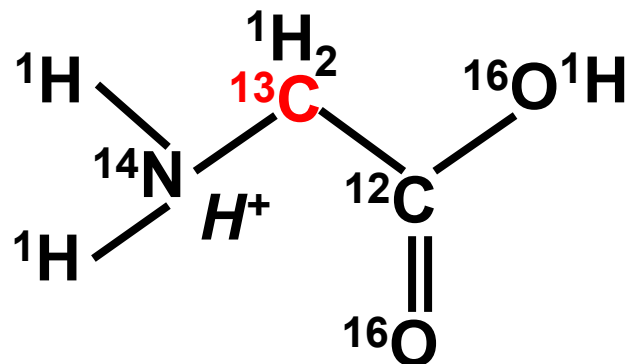
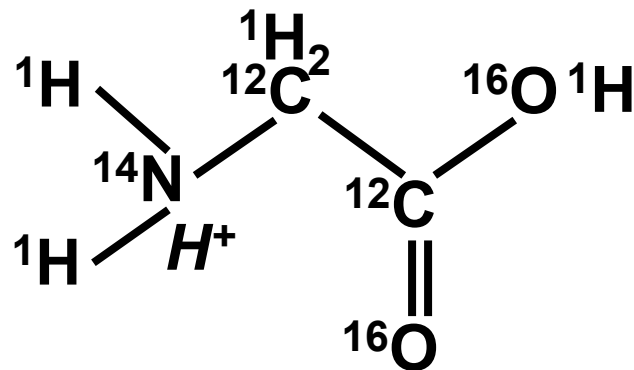
$1 \times ^2\text{H} + 1 \times ^{17}\text{O}$

$1 \times ^2\text{H} + 1 \times ^{33}\text{S}$

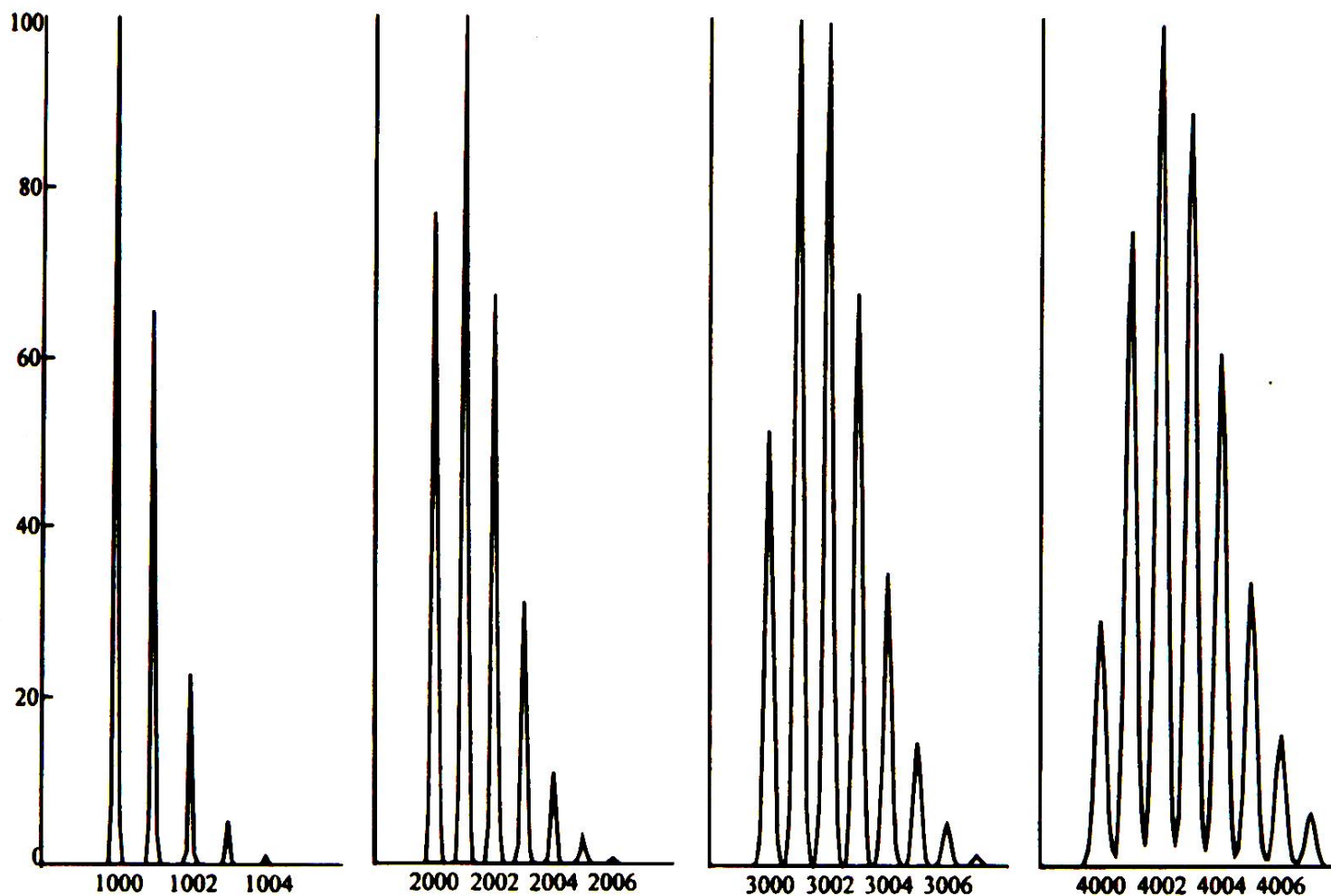
$1 \times ^{15}\text{N} + 1 \times ^{17}\text{O}$

$1 \times ^{15}\text{N} + 1 \times ^{33}\text{S}$

$1 \times ^{17}\text{O} + 1 \times ^{33}\text{S}$



# Teoretická izotopová obálka peptidy s $m/z$ 1000-4000 Da



**Figure 4.** Theoretical isotope distributions of peptides of 1000, 2000, 3000 and 4000 Da.

# Atomové hmotnosti

## Monoizotopická a průměrná...

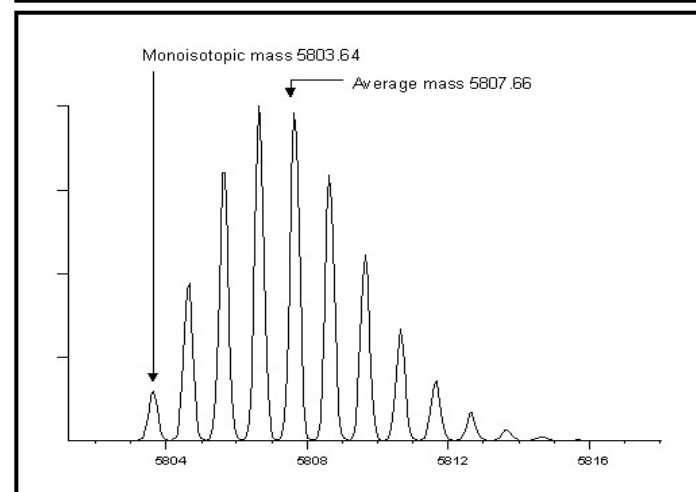
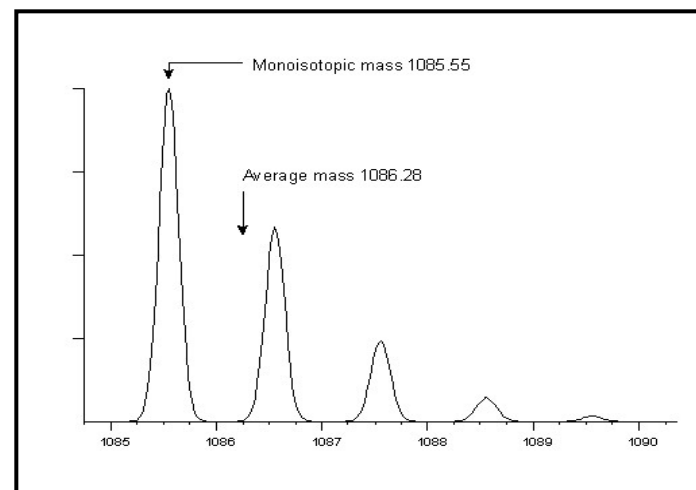
**C      12.000      12.011**

**H      1.0078      1.008**

**N      14.003      14.007**

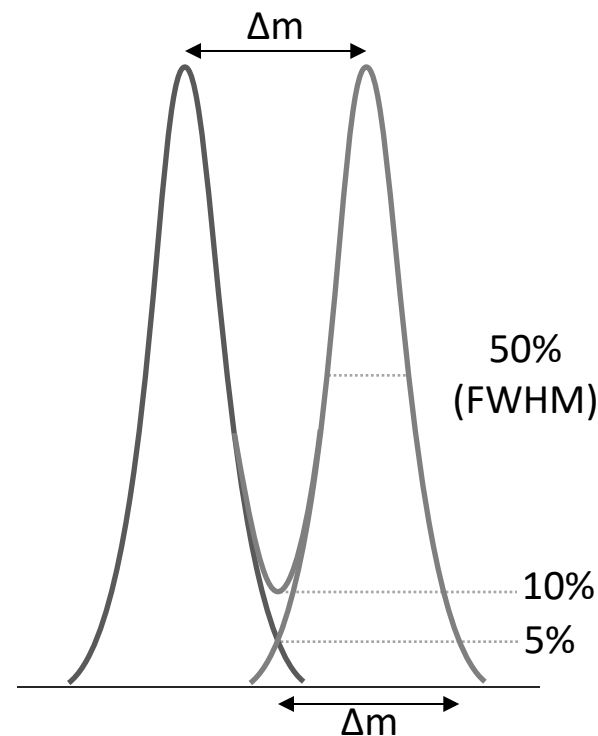
**O      15.995      15.999**

**P      30.974      30.974**

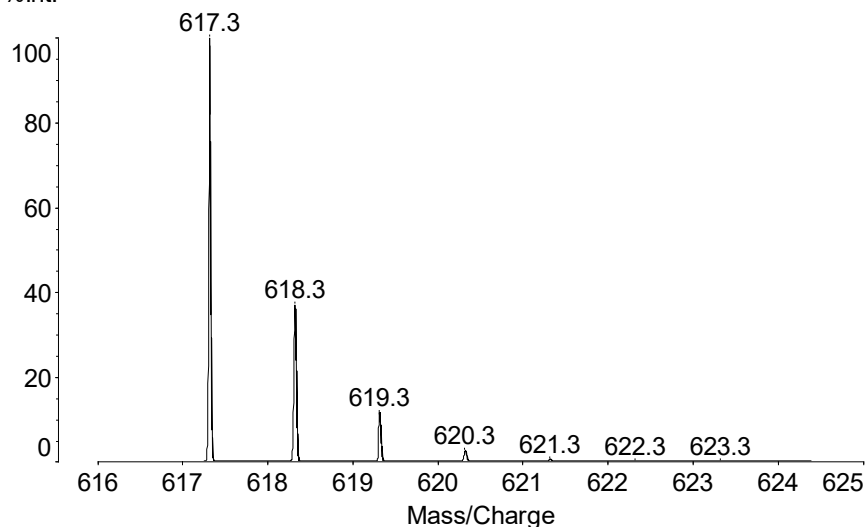


# Rozlišení

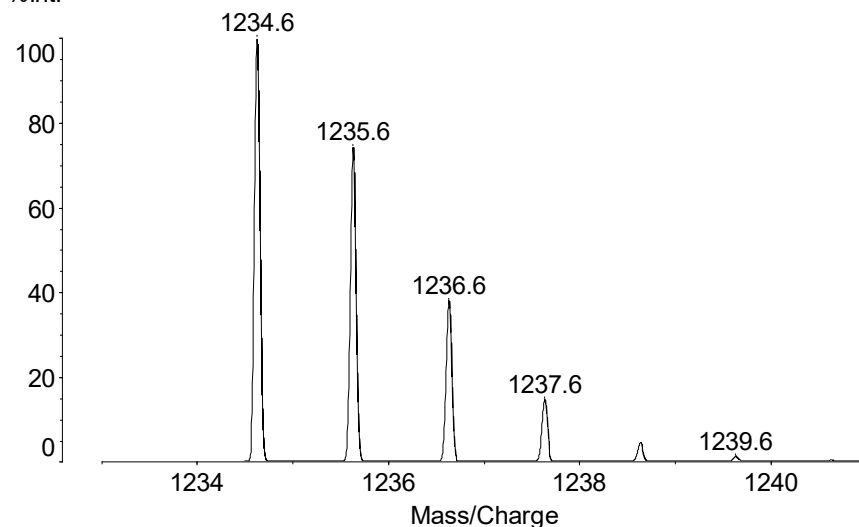
- Rozlišení / rozlišovací schopnost
- IUPAC:  $R = m/\Delta m$   
( $R$  – resolving power,  $\Delta m$  - resolution)
- Záleží jak je definováno  $\Delta m$ 
  - šířka jednotlivého píku v určité výšce (5%, 50% - FWHM)
  - 10% údolí mezi dvěma píky



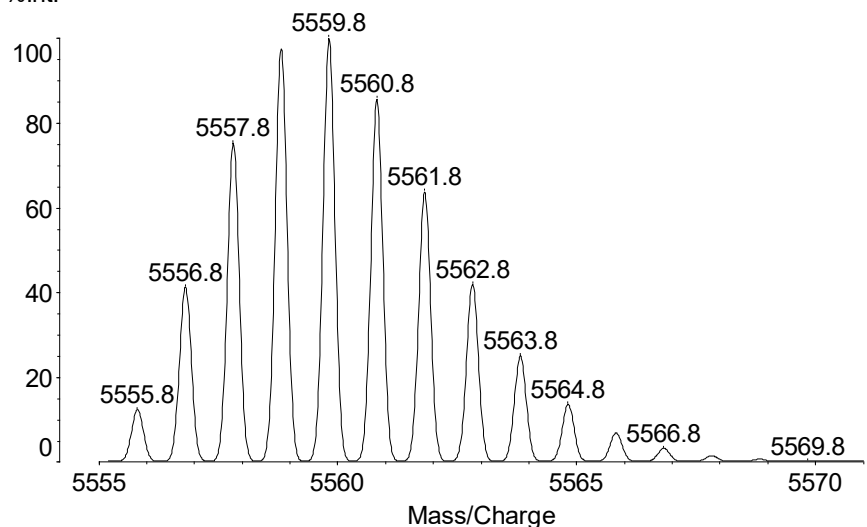
Molecular formula: C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S Resolution: 20000 at 50%  
%Int.



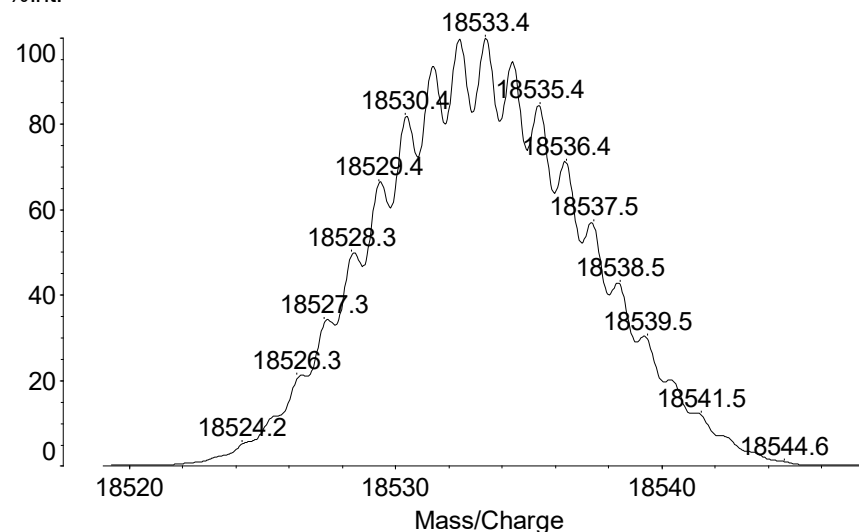
Molecular formula: C<sub>60</sub>H<sub>90</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub> Resolution: 20000 at 50%  
%Int.



Molecular formula: C<sub>270</sub>H<sub>405</sub>N<sub>54</sub>O<sub>54</sub>S<sub>9</sub> Resolution: 20000 at 50%  
%Int.

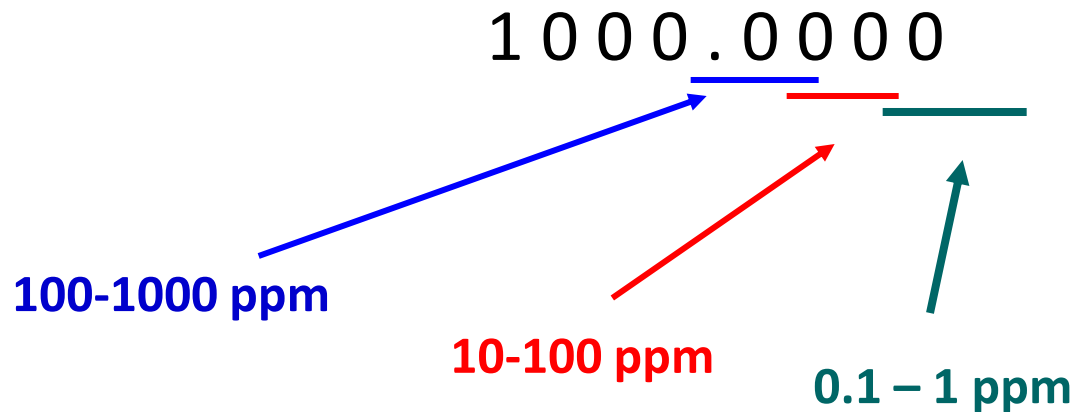


Molecular formula: C<sub>900</sub>H<sub>1350</sub>N<sub>180</sub>O<sub>180</sub>S<sub>30</sub> Resolution: 20000 at 50%  
%Int.

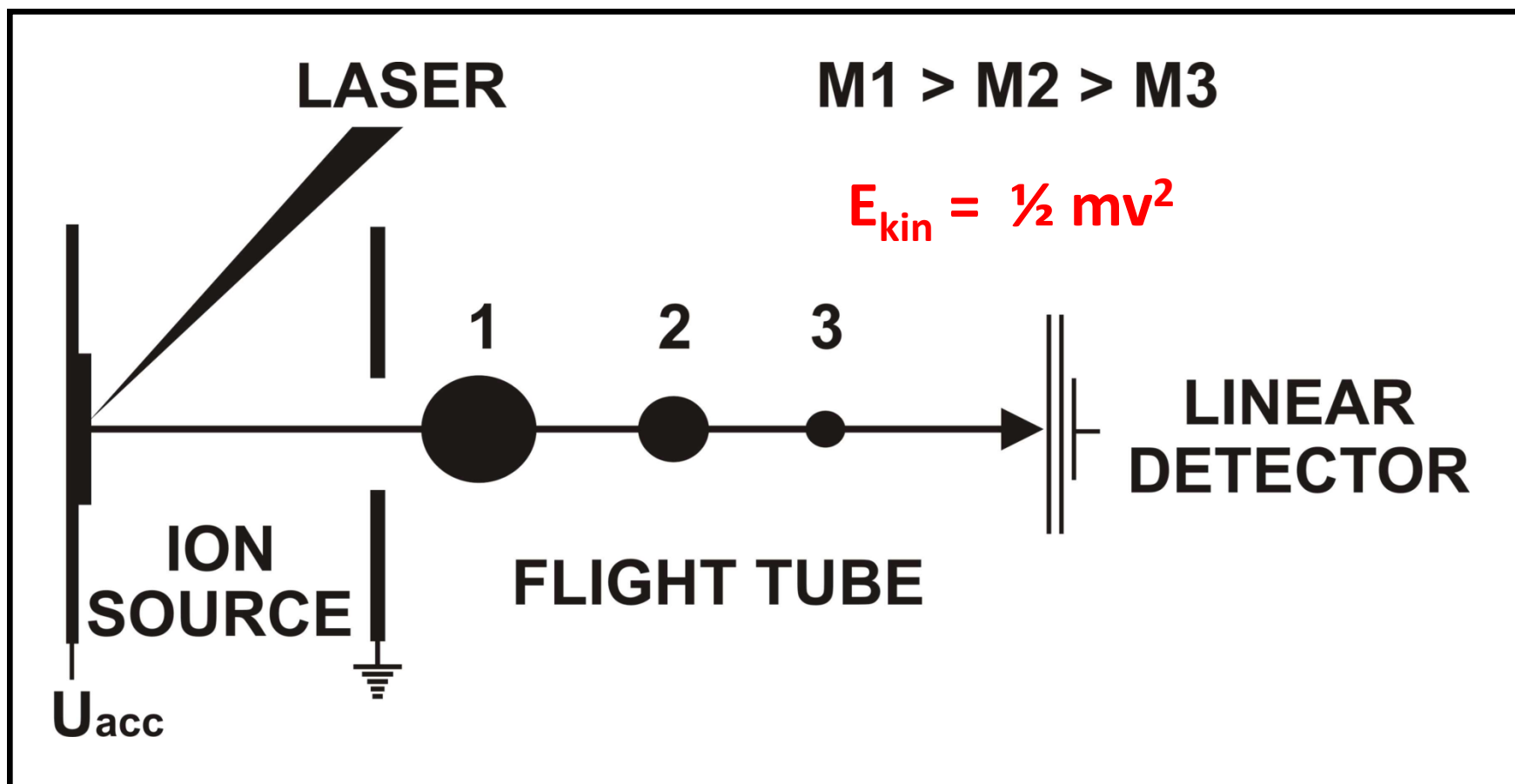


# Chyba měření

- Da – Dalton - 0.1 – 0.0001
- Th – Thompson – 0.1 – 0.0001
- ppm – parts per million – 100 – 0.1  
*ppm chyba = 1e6x(naměřená M-teoretická M)/teoretická M*
- %

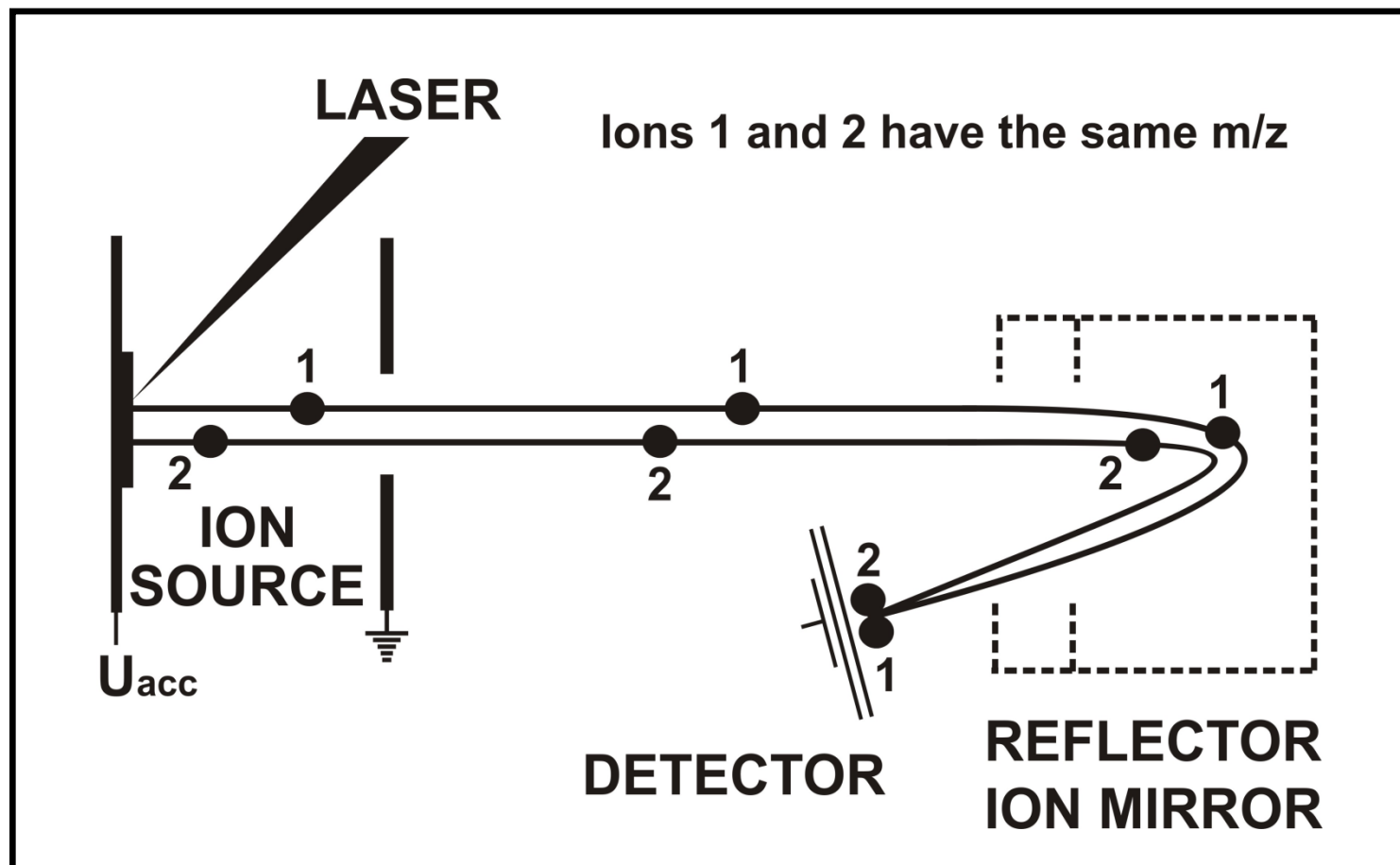


# Time Of Flight (TOF) Analyzátor



# Time Of Flight (TOF) - reflekttron

**R  $10^4$**   
**1ppm**

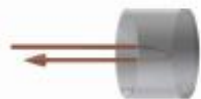


# Time Of Flight (TOF) - design

(a) Linear TOF-MS



(b) Reflector-TOF-MS



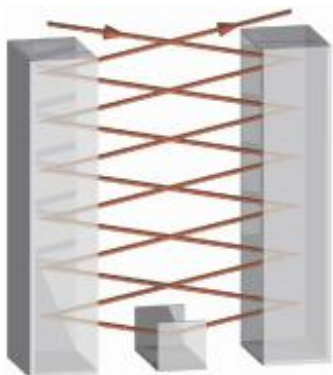
(c) Multiple-Reflection TOF-MS (closed Path)



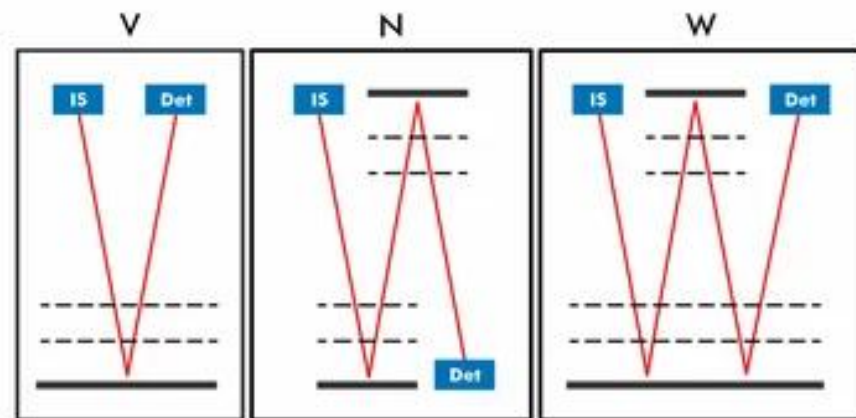
(d) Multiple-Turn TOF-MS (closed path)



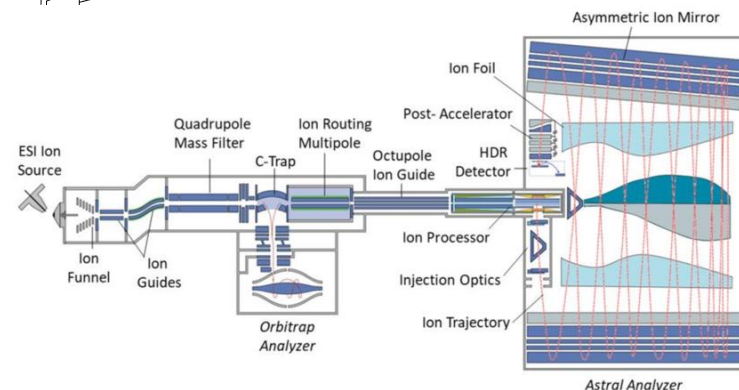
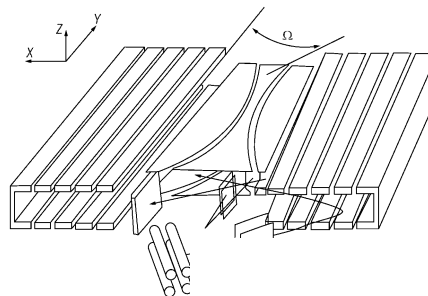
(e) Multiple-Reflection TOF-MS (open Path)



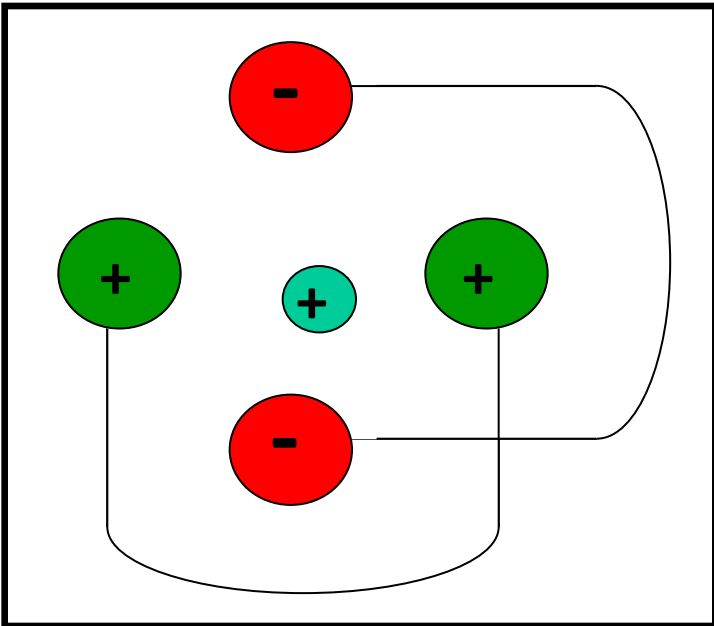
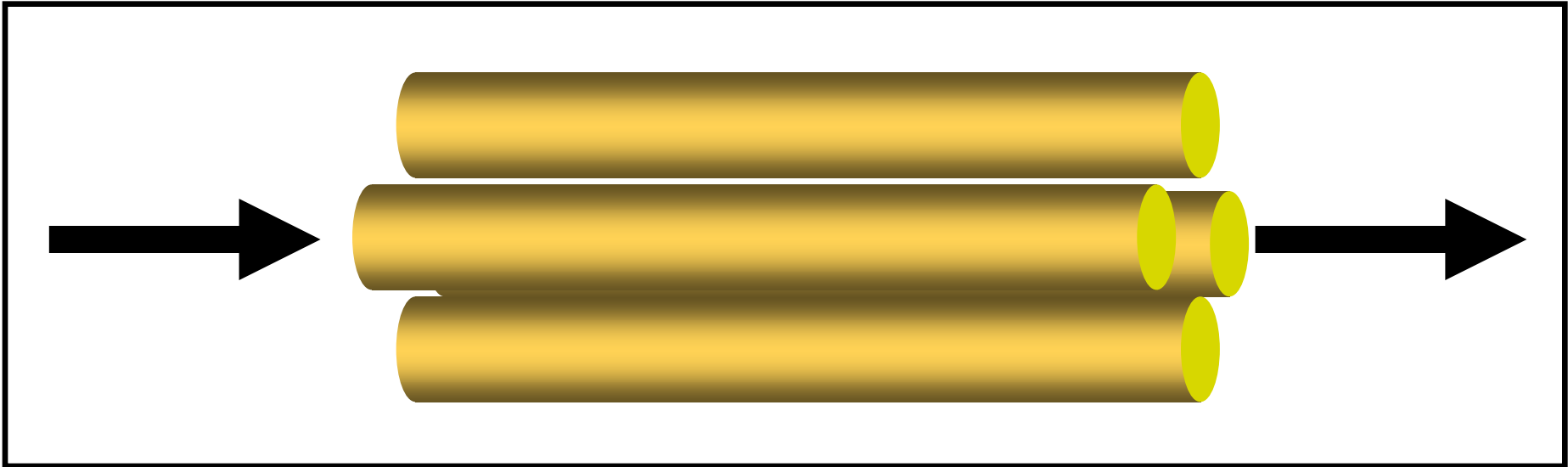
(f) Multiple-Turn TOF-MS (open path)



**mrTOF ASTRAL (Thermo)**



# Kvadrupólový analyzátor



Tyče optimálně hyperbola, reálně kruhový průřez.

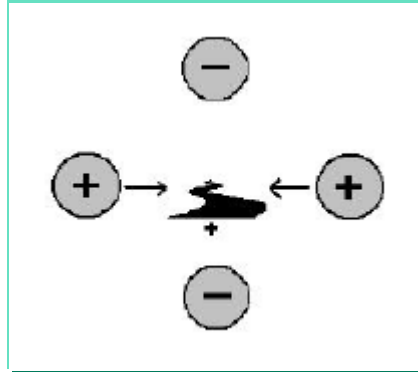
Stejné polarity na protilehlých tyčích.

Stejnoseměrné a střídavé vysokofrekvenční napětí - DC a RF

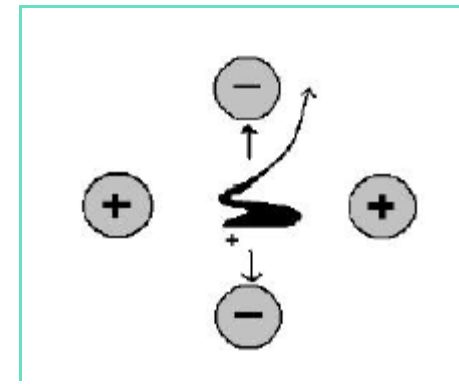
Rozdílný pohyb „velkých“ a „malých“ iontů

# Kvadrupólový analyzátor

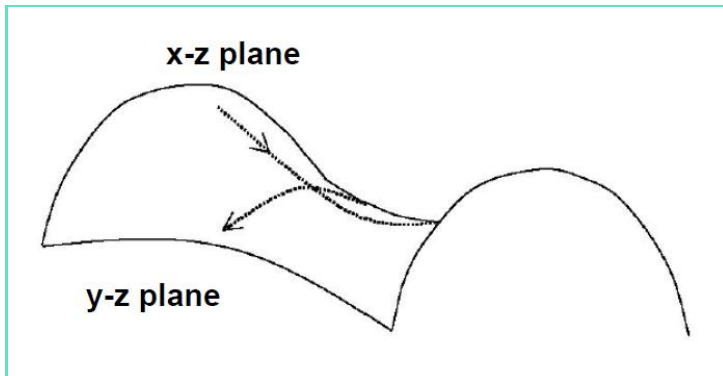
Vliv stejnosměrného napětí (platí pro + ionty)



Stabilizace



Destabilizace

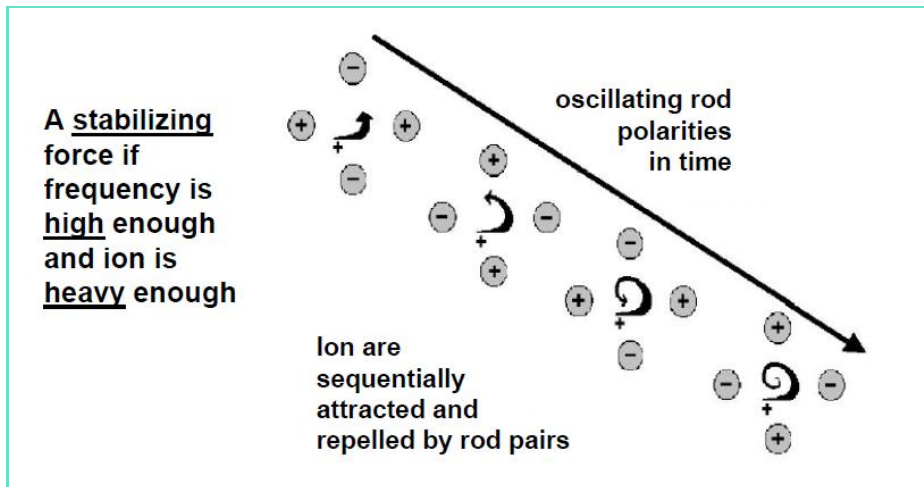


Potenciálová plocha – přiblížení - tvar sedla

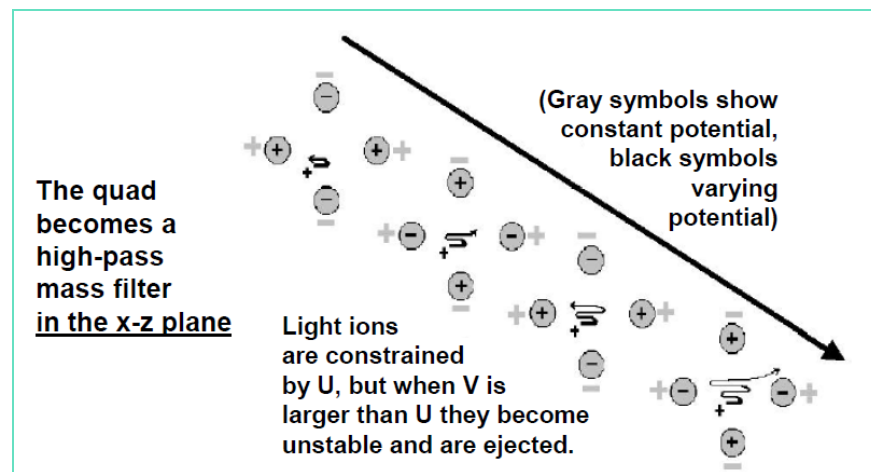
# Kvadrupólový analyzátor

**R  $10^3$**   
**100ppm**

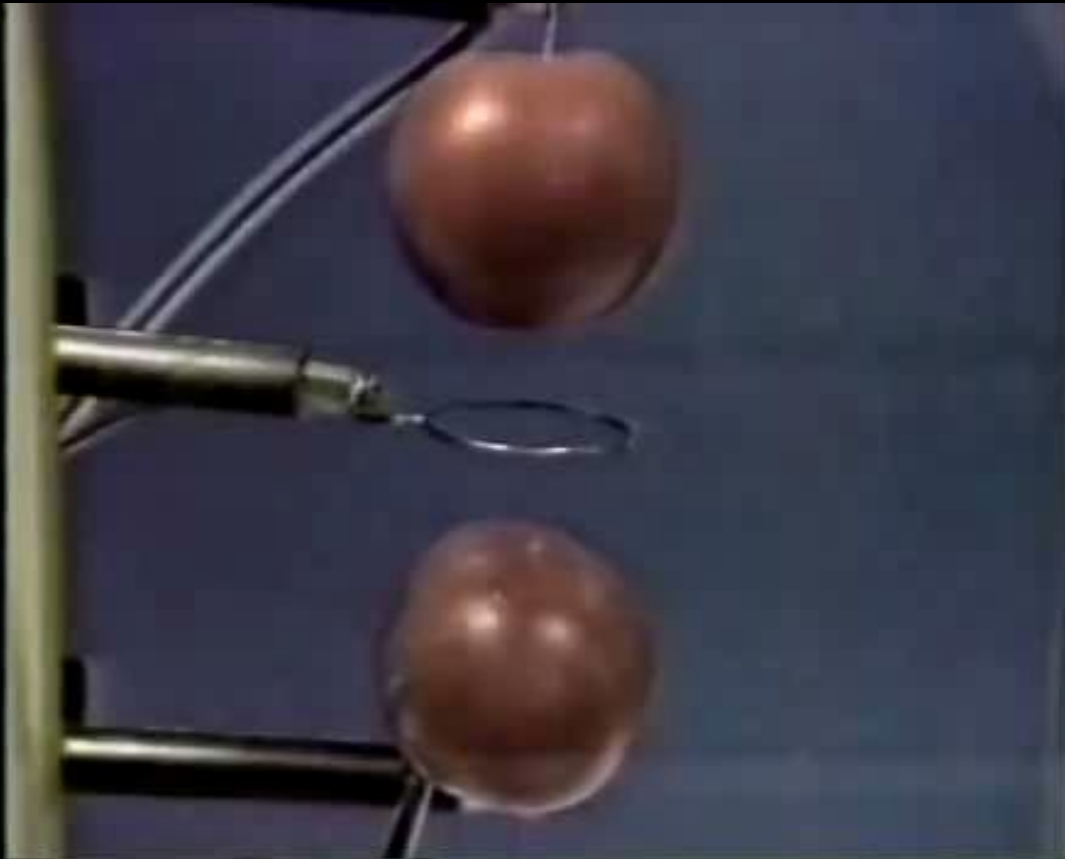
Vliv RF složky – pohyb iontů kvadrupólem



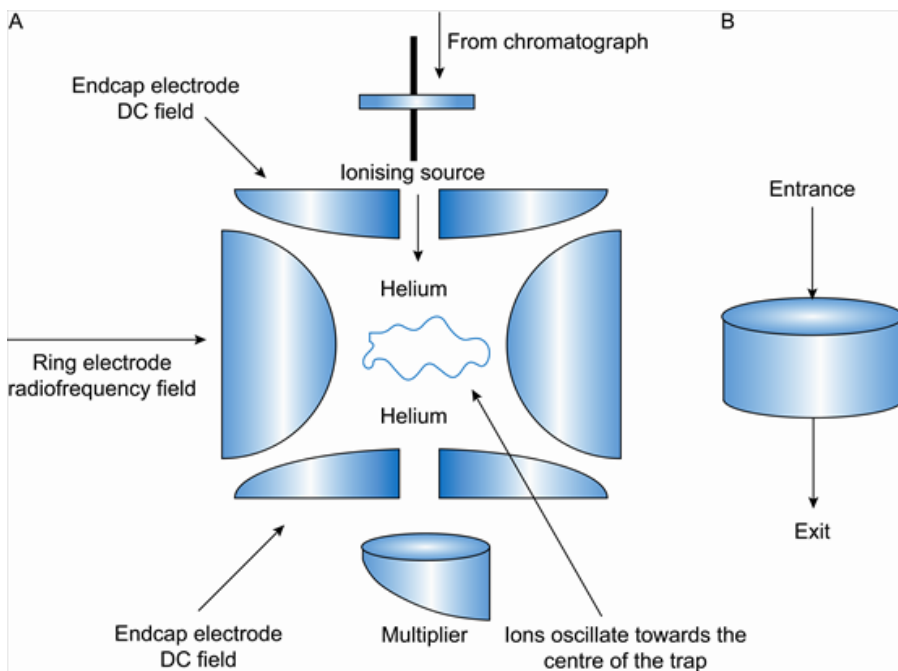
Vliv RF složky – pohyb iontů kvadrupólem



# lontová past

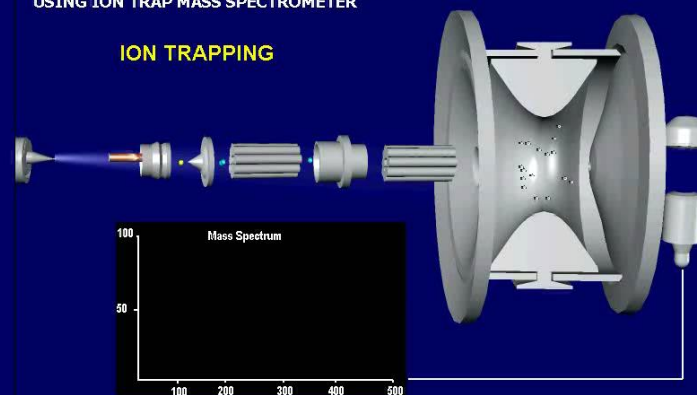


# Iontová past



## OVERVIEW OF AN ELECTROSPRAY IONIZATION USING ION TRAP MASS SPECTROMETER

### ION TRAPPING

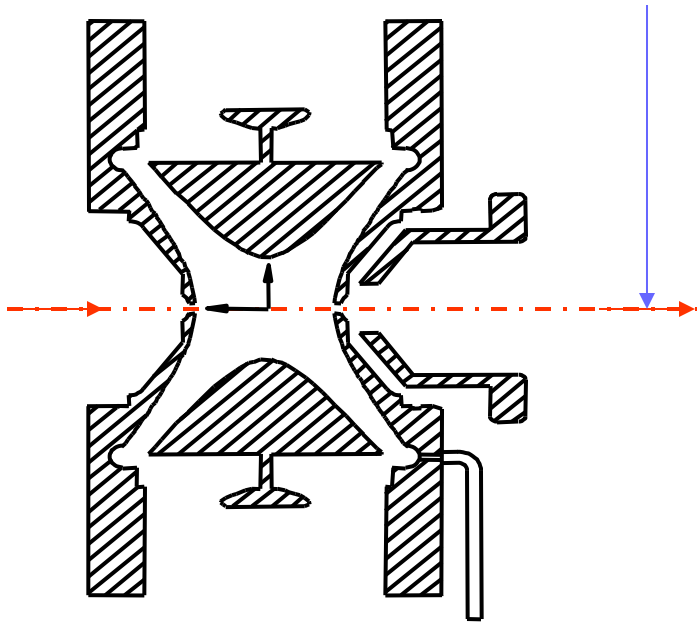


TRAPPING SCANNING DETECTION ZOOM IN/OUT ZOOM MS  
PLAY STOP LABEL VIEW QUIT

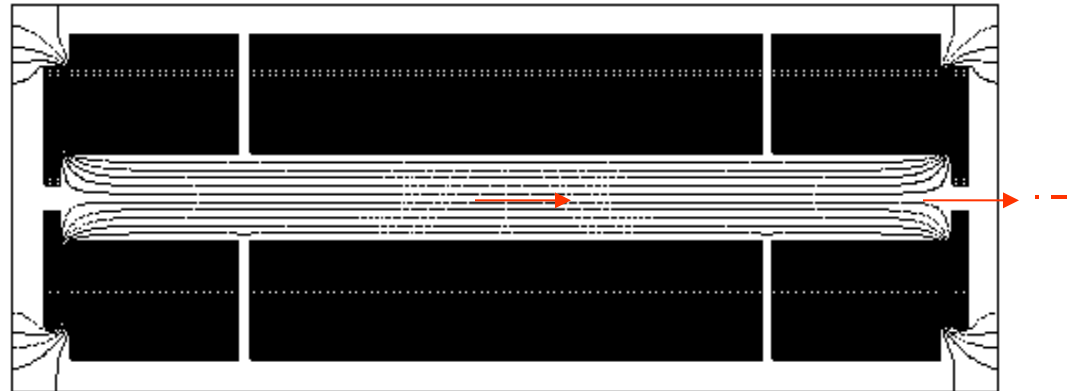
# Iontové pasti

$R \cdot 10^3$   
100ppm

Osa pohybu iontů (z)



3D (sférická) iontová past



2D (lineární) iontová past

# FT-ICR – Iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

**Pohyb iontů v magnetickém poli** - iont s hmotností  $m$ , pohybující se s rychlostí  $\mathbf{v}$  v homogenním magnetickém poli se silou  $\mathbf{B}$ :

$$\mathbf{F} = q\mathbf{v} \times \mathbf{B}$$

Iont pohybující se po **cyklotronové** orbitě s frekvencí danou vztahem:

$$2\pi f = \frac{q\mathbf{B}}{m}$$

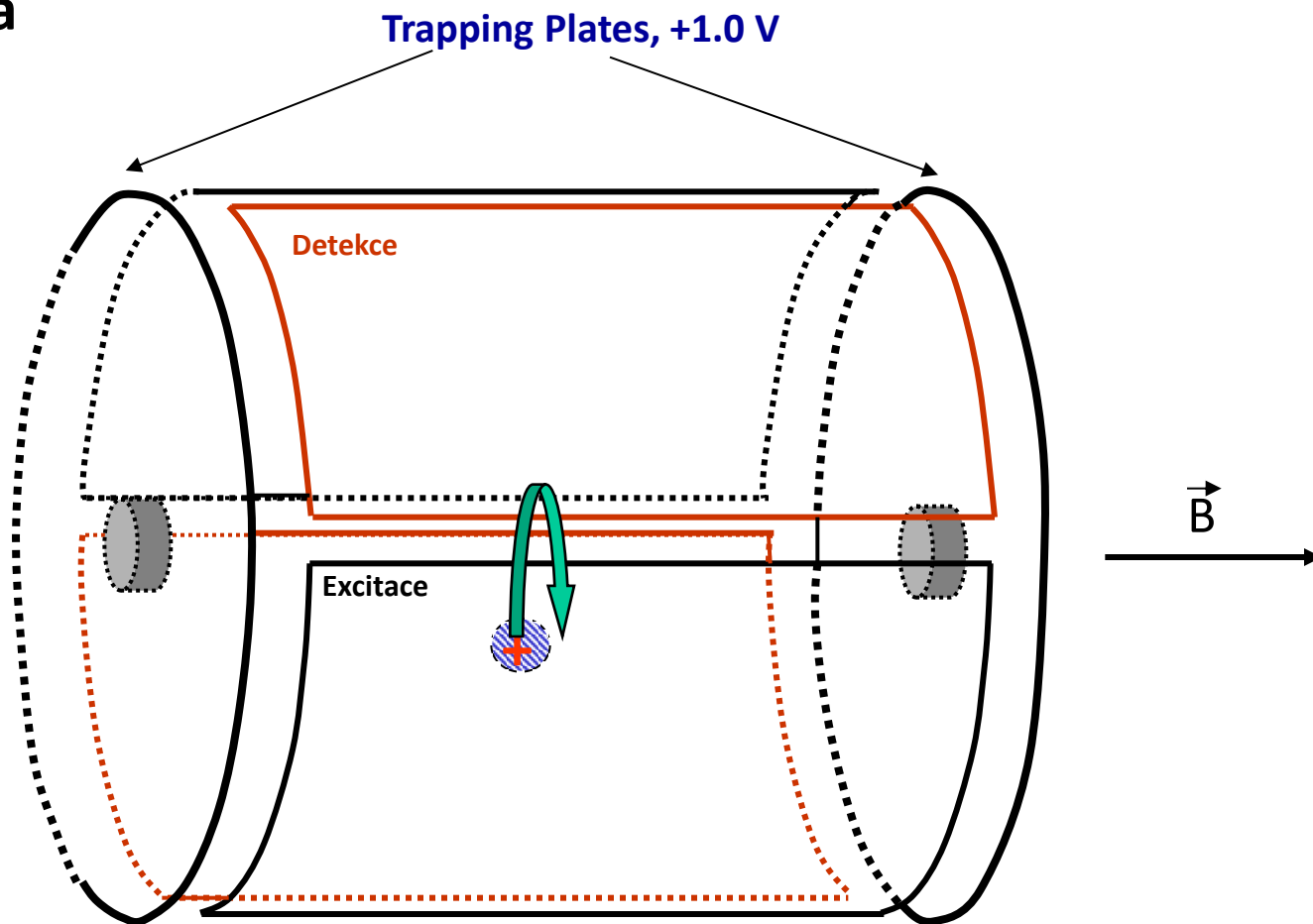
Poloměr běžné cely: 1-3 cm

Počáteční poloměr pohybu iontu: 0.01 - 0.1 mm

Běžná síla magnetického pole: 1-15(21) Tesla

# Pohyb iontů v magnetickém poli

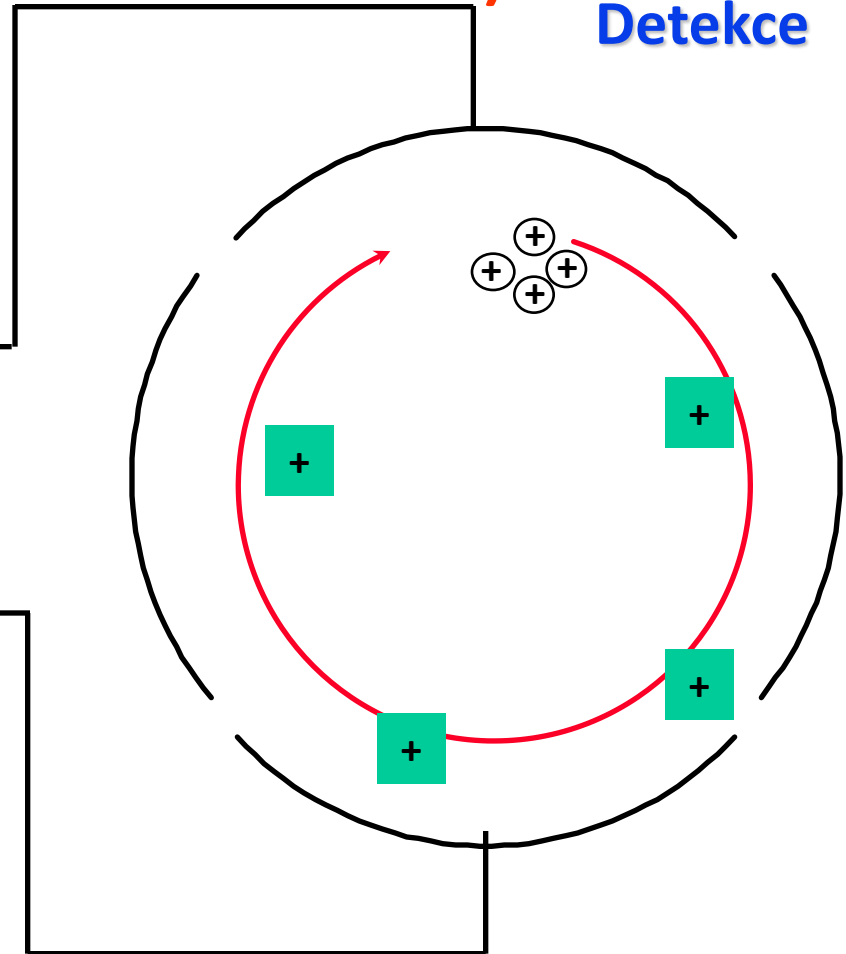
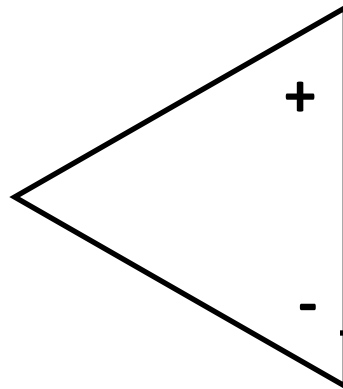
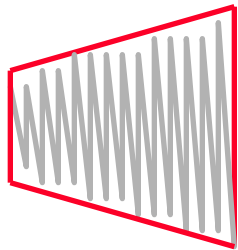
FTMS cela



# Fourierova transformace

## (Iontově Cyklotronová Resonance)

$$f = \frac{q\mathbf{B}}{2\pi m}$$

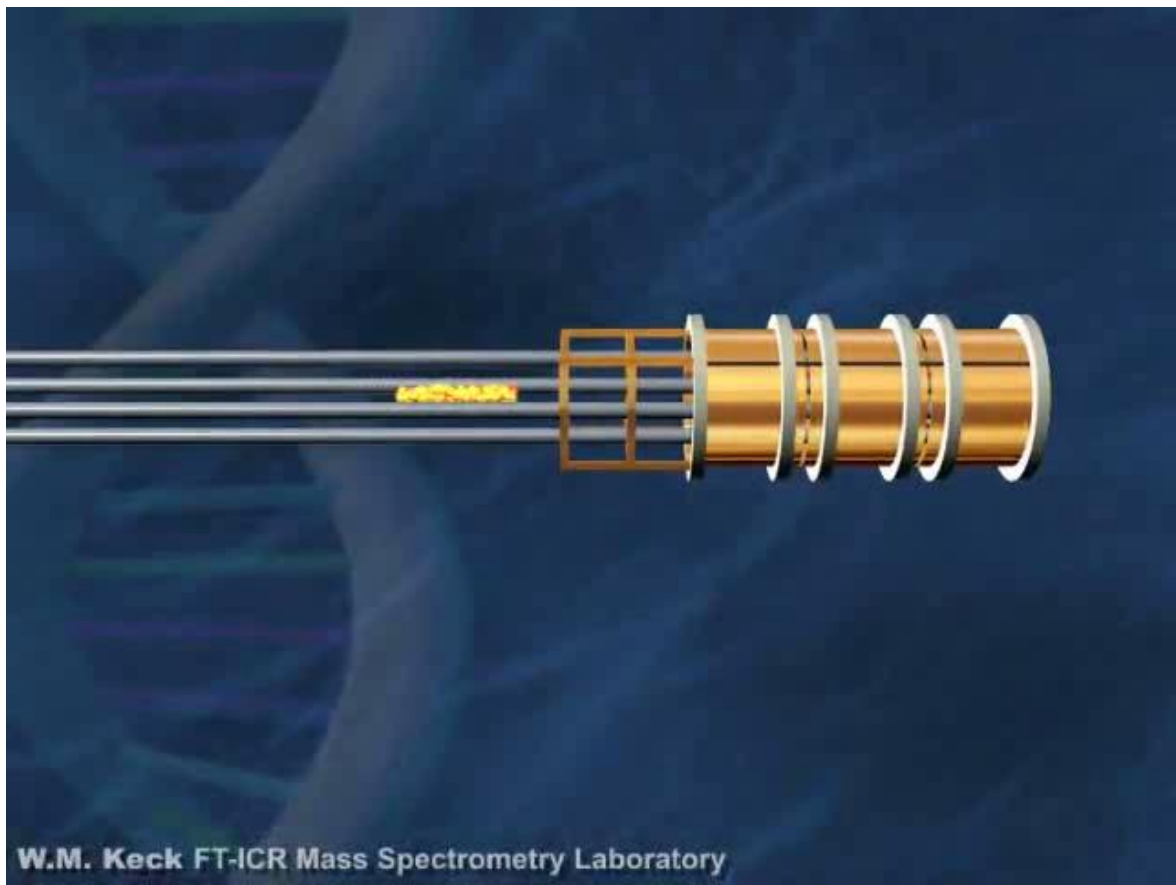


Koherentní cyklotronový pohyb indukuje „proudový obraz“, který je amplifikován a detekován.

Přítomnost iontů s různými  $m/z$  se projeví jako superpozice sinusoidálních signálů na Detektoru.

# FT-ICR – Iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

**R  $10^5$  a více**  
**0.1ppm**

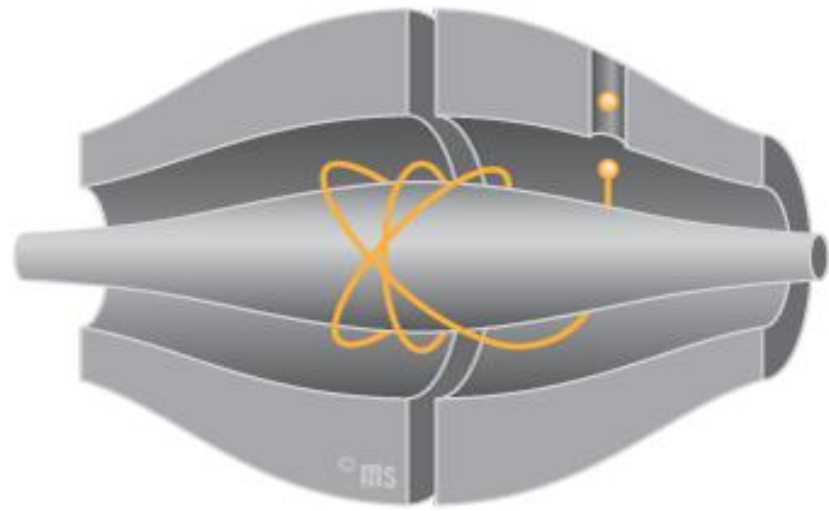


# ORBITRAP

**R  $10^4$  (a více)**

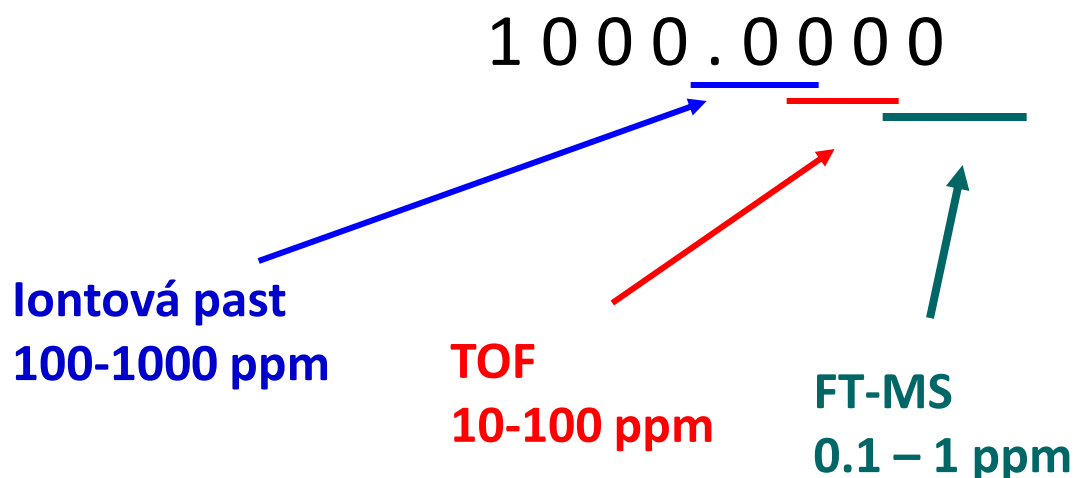
**1ppm**

- Alexander A. Makarov
- Elektrostatická past
- Ionty rotují kolem centrální elektrody + harmonické oscilace podél této elektrody
- Indukce proudu – FT - MS



# Srovnání analyzátorů

- Da – Dalton - 0.1 – 0.0001
- Th – Thompson – 0.1 – 0.0001
- ppm – parts per million – 100 – 0.1  
*ppm chyba =  $1e6 \times (\text{naměřená } M - \text{teoretická } M) / \text{teoretická } M$*
- %

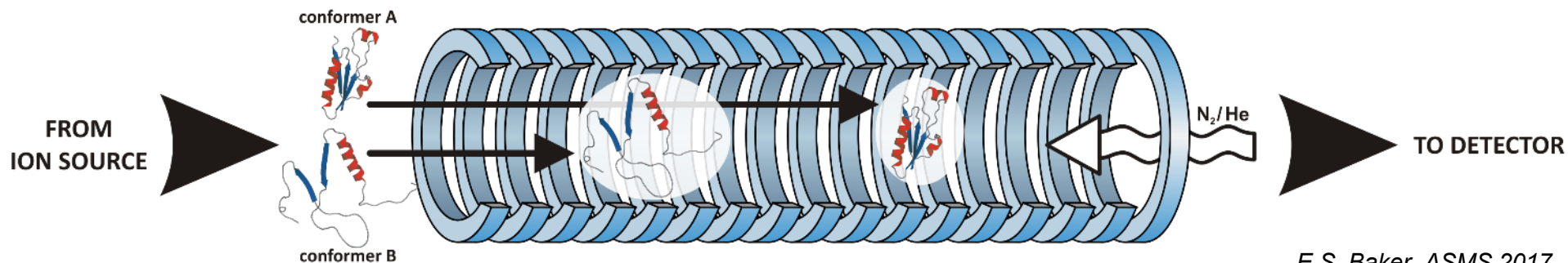
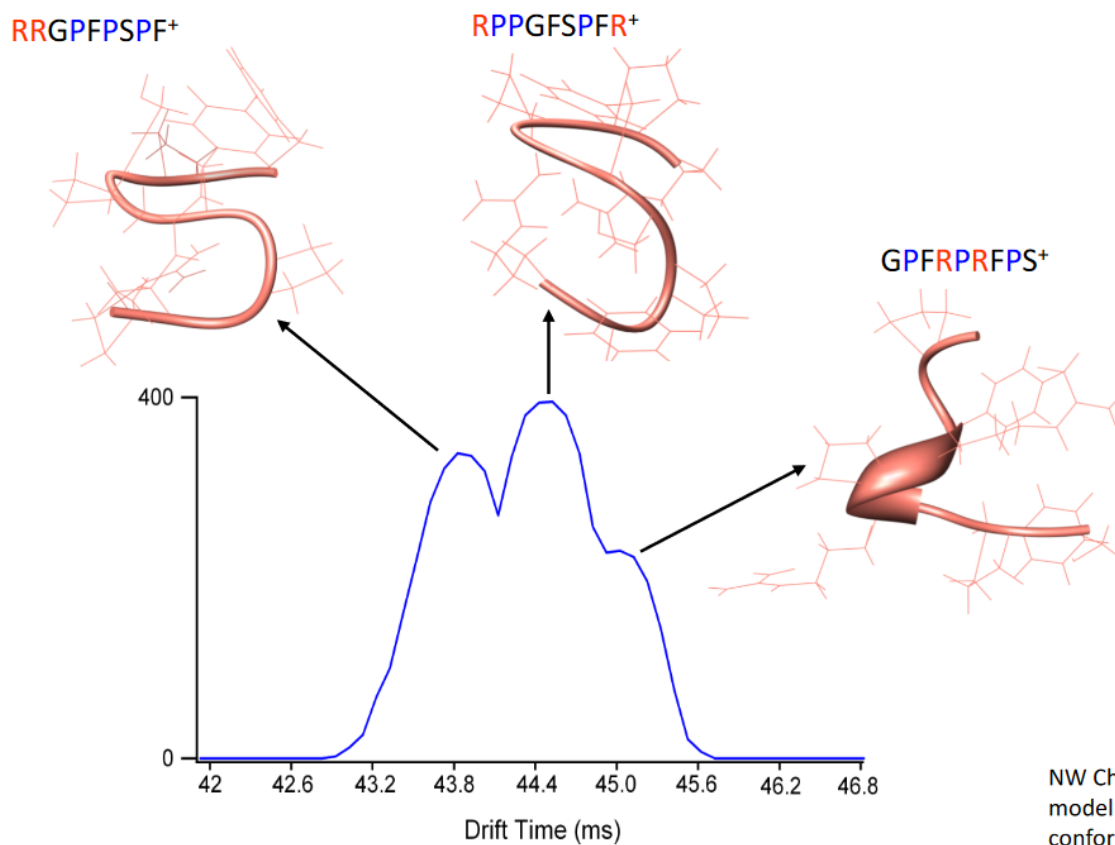


# Srovnání analyzátorů

|                        | mass range | resolution | accuracy | dynamic range |
|------------------------|------------|------------|----------|---------------|
| <b>quadrupole</b>      | 4000       | 4000       | 100ppm   | 1.E+05        |
| <b>Ion Trap</b>        | 6000       | 4000       | 100ppm   | 1.E+04        |
| <b>TOF</b>             | unlimited  | 50000      | 5ppm     | 1.E+04        |
| <b>FT-ICR</b>          | 10000      | >10e7      | 0.1ppm   | 1.E+04        |
| <b>Orbitrap</b>        | 4000       | >200000    | 1ppm     | 1.E+04        |
| <b>Magnetic sector</b> | 10000      | 100000     | 10ppm    | 1.E+07        |

**Rozlišení VS rychlost skenu!**

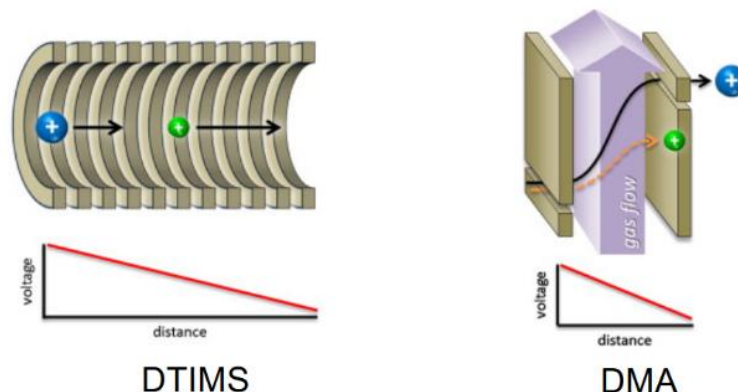
# Iontová mobilita – rozdělení dle konformace



# Iontová mobilita – různá uspořádání

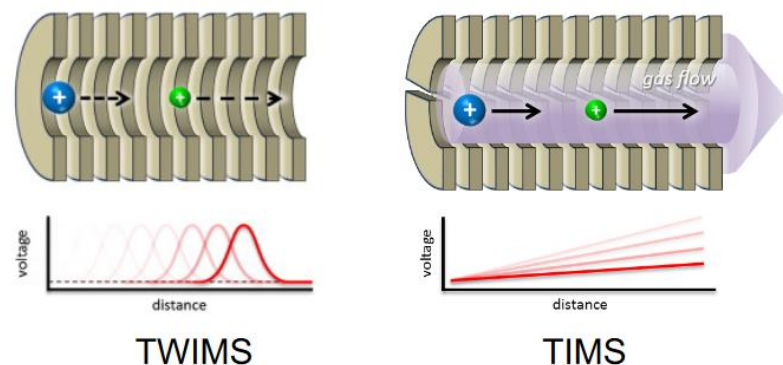
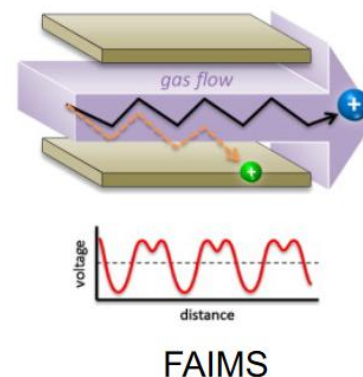
## Statické pole

- Drift Tube IMS (DTIMS)
- Differential Mobility Analyzer (DMA)



## Dynamické pole

- Field Asymmetric IMS (FAIMS)
- Traveling Wave IMS (TWIMS)
- Trapped IMS (TIMS)



# Fragmentace – cesta ke struktuře / sekvenci

Dochází k fragmentaci během-následkem ionizace

EI, FAB

ISD, ISF - In-Source Decay/Fragmentation

PSD - Post-Source Decay

Fragmentaci cíleně indukujeme

- vysoko- VS. nízkoenergetická

- srážky s plynem (He, Ar, N<sub>2</sub>) - CID – Collision Induced Dissociation, CAD – Collisionally Activated Dissociation (SORI - sustained off-resonance irradiation)

- srážky s povrchem – SID – Surface Induced Dissociation

- záchyt / transfer elektronu ECD / ETD / EDD – Electron Capture / Transfer / Detachment Dissociation

- indukovaná laserem - IRMPD – Infrared Multi-Photon Dissociation, UVPD – UltraViolet PhotoDissociation

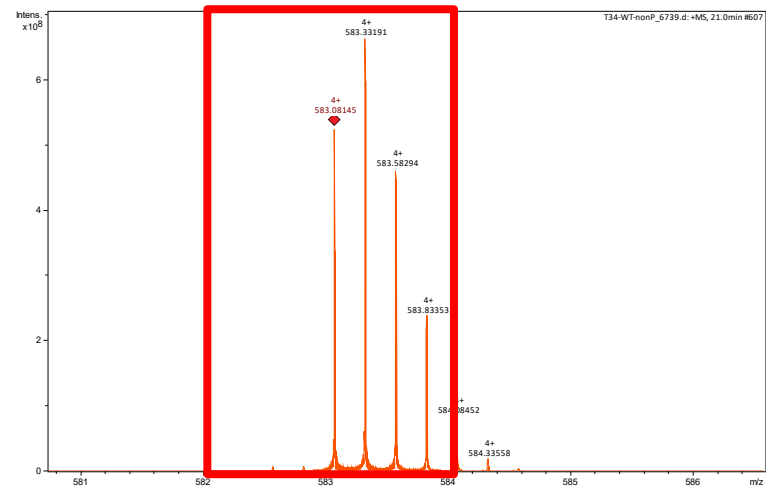
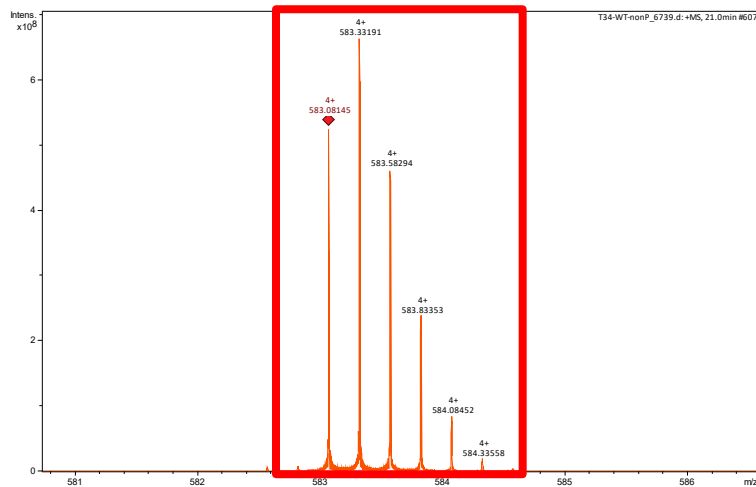
Prekurzor

Fragmenty /  
produktové ionty

**Hovoříme o MS/MS, MS<sup>2</sup>, MS<sup>2</sup> ...případně o MS<sup>n</sup>**

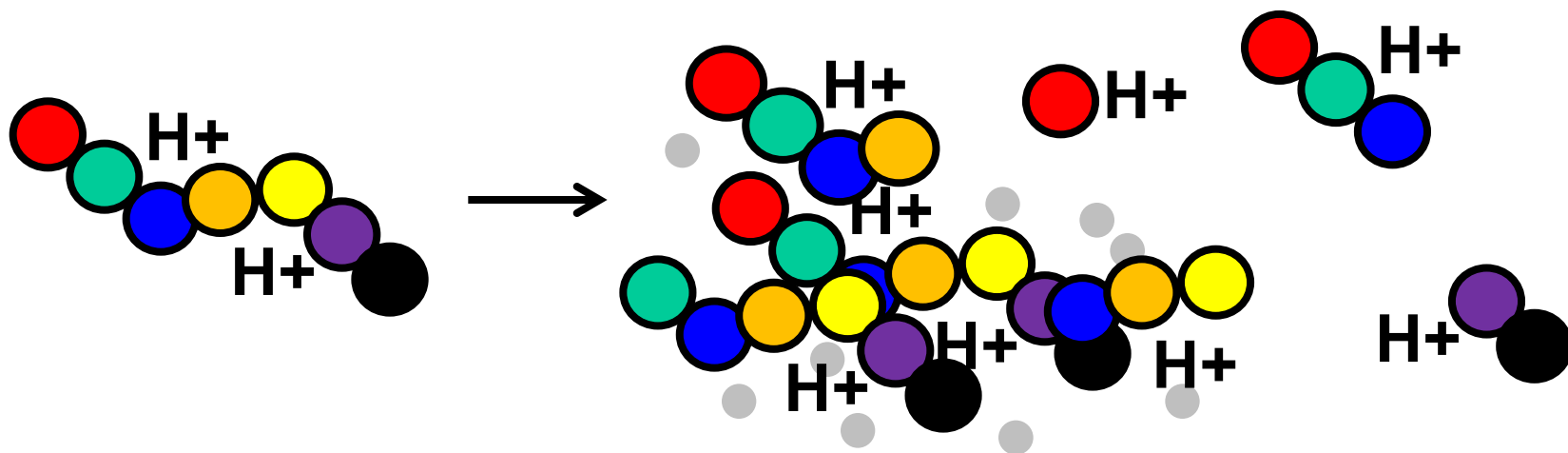
# Cílené disociace

1. Krok – izolace daného  $m/z$  (tzv. izolační okno – 2 a.m.u., 6 a.m.u).  
Pozor na střed izolace – monoizotop nebo průměr!  
“ořez izotopů” / překryvy (ko-fragmentace) / odstup v kvantifikaci

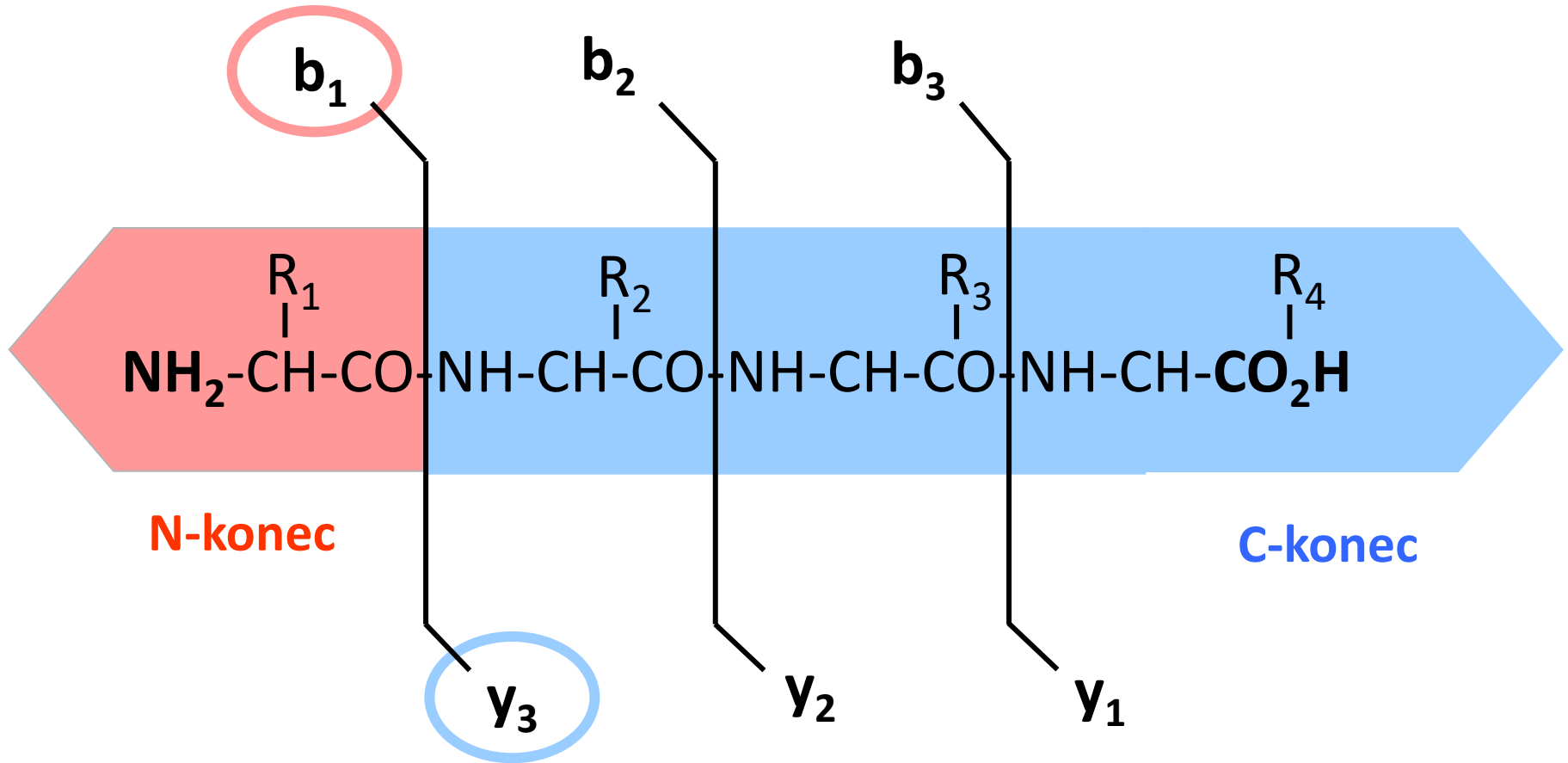


2. Krok - fragmentace

# CID – collision induced dissociation – kolizně indukovaná disociace



# Fragmentace peptidu



# Fragmentace peptidu

**S-P-A-F-D-S-I-M-A-E-T-L-K**

**MH<sup>+</sup> = 1410.6**

## **b-ions<sup>+</sup>**

|               |                           |                     |
|---------------|---------------------------|---------------------|
| <b>88.1</b>   | <b>S</b> .....            | <b>PAFDSIMAETLK</b> |
| <b>185.2</b>  | <b>SP</b> .....           | <b>AFDSIMAETLK</b>  |
| <b>256.3</b>  | <b>SPA</b> .....          | <b>FDSIMAETLK</b>   |
| <b>403.5</b>  | <b>SPAF</b> .....         | <b>DSIMAETLK</b>    |
| <b>518.5</b>  | <b>SPAFD</b> .....        | <b>SIMAETLK</b>     |
| <b>605.6</b>  | <b>SPAFDS</b> .....       | <b>IMAETLK</b>      |
| <b>718.8</b>  | <b>SPAFDSI</b> .....      | <b>MAETLK</b>       |
| <b>850.0</b>  | <b>SPAFDSIM</b> .....     | <b>AETLK</b>        |
| <b>921.1</b>  | <b>SPAFDSIMA</b> .....    | <b>ETLK</b>         |
| <b>1050.2</b> | <b>SPAFDSIMAE</b> .....   | <b>TLK</b>          |
| <b>1151.3</b> | <b>SPAFDSIMAET</b> .....  | <b>LK</b>           |
| <b>1264.4</b> | <b>SPAFDSIMAETL</b> ..... | <b>K</b>            |

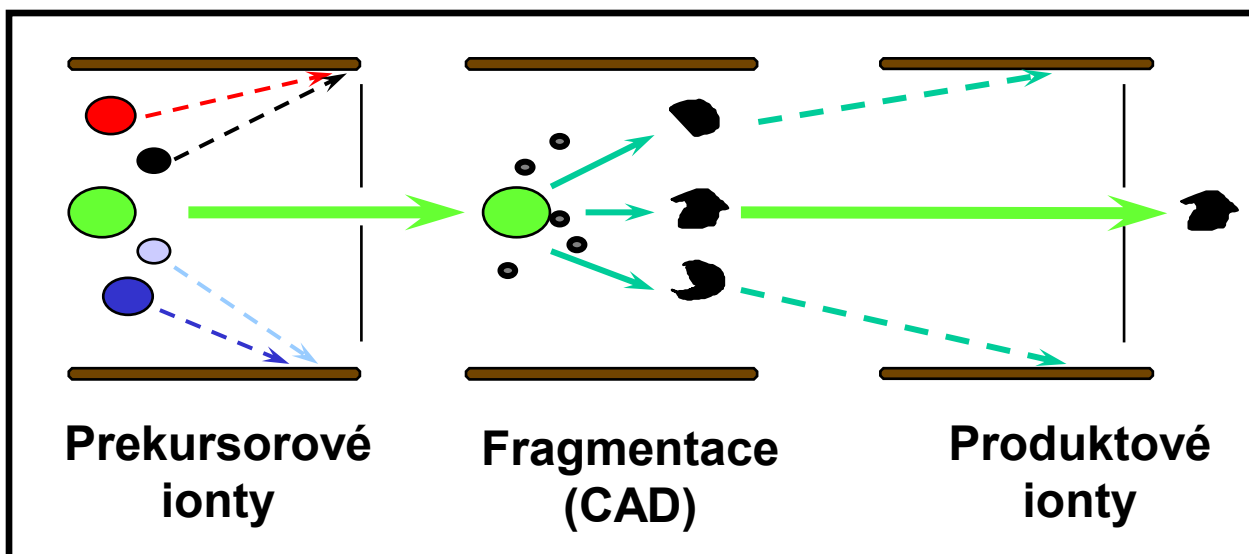
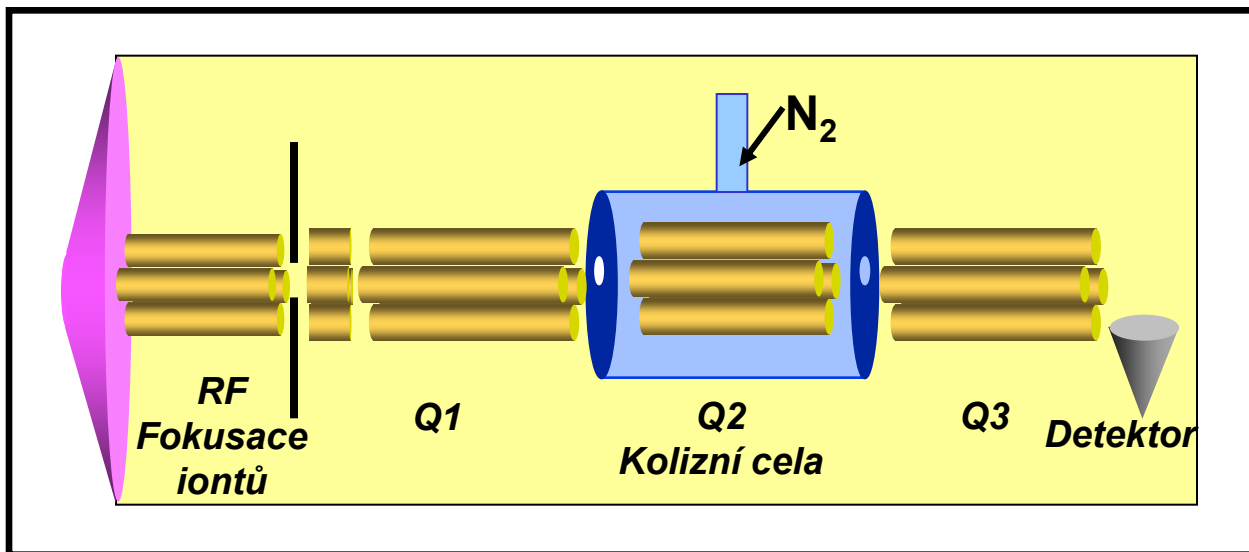
## **y-ions<sup>+</sup>**

|               |
|---------------|
| <b>1323.6</b> |
| <b>1226.4</b> |
| <b>1155.4</b> |
| <b>1008.2</b> |
| <b>893.1</b>  |
| <b>806.0</b>  |
| <b>692.3</b>  |
| <b>561.7</b>  |
| <b>490.6</b>  |
| <b>361.5</b>  |
| <b>260.4</b>  |
| <b>147.2</b>  |

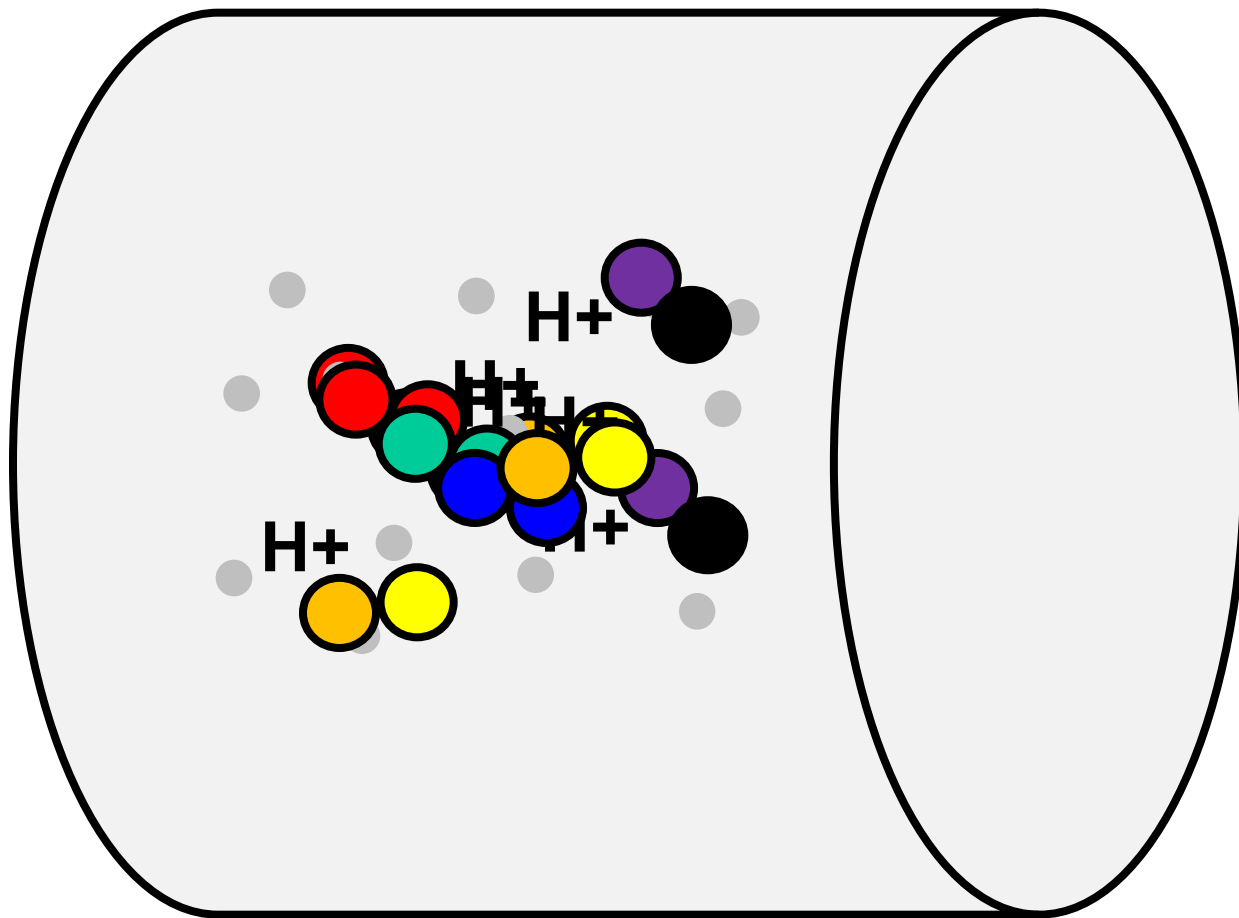
# Přehled aminokyselin v číslech

| AK |     | Hmotnost | Boční řetězec | Immoniové ionty               |
|----|-----|----------|---------------|-------------------------------|
| G  | Gly | 57.02    | 1             | 30                            |
| A  | Ala | 71.08    | 15            | 44                            |
| S  | Ser | 87.03    | 31            | 60                            |
| P  | Pro | 97.05    | 41            | 70                            |
| V  | Val | 99.07    | 43            | 72                            |
| T  | Thr | 101.05   | 45            | 74                            |
| C  | Cys | 103.01   | 47            | 76                            |
| L  | Leu | 113.08   | 57            | 86(72)                        |
| I  | Ile | 113.08   | 57            | 86(72)                        |
| N  | Asn | 114.04   | 58            | 87(70)                        |
| D  | Asp | 115.03   | 59            | 88                            |
| Q  | Gln | 128.06   | 72            | 101(84, 129)                  |
| K  | Lys | 128.09   | 72            | 101(129, 112, 84, 70)         |
| E  | Glu | 129.04   | 73            | 102                           |
| M  | Met | 131.04   | 75            | 104(61)                       |
| H  | His | 137.06   | 81            | 110(166, 138, 123, 121, 82)   |
| F  | Phe | 147.07   | 91            | 120(91)                       |
| R  | Arg | 156.10   | 100           | 129(112, 100, 87, 73, 70, 59) |
| Y  | Tyr | 163.06   | 107           | 136                           |
| W  | Trp | 186.08   | 130           | 159                           |

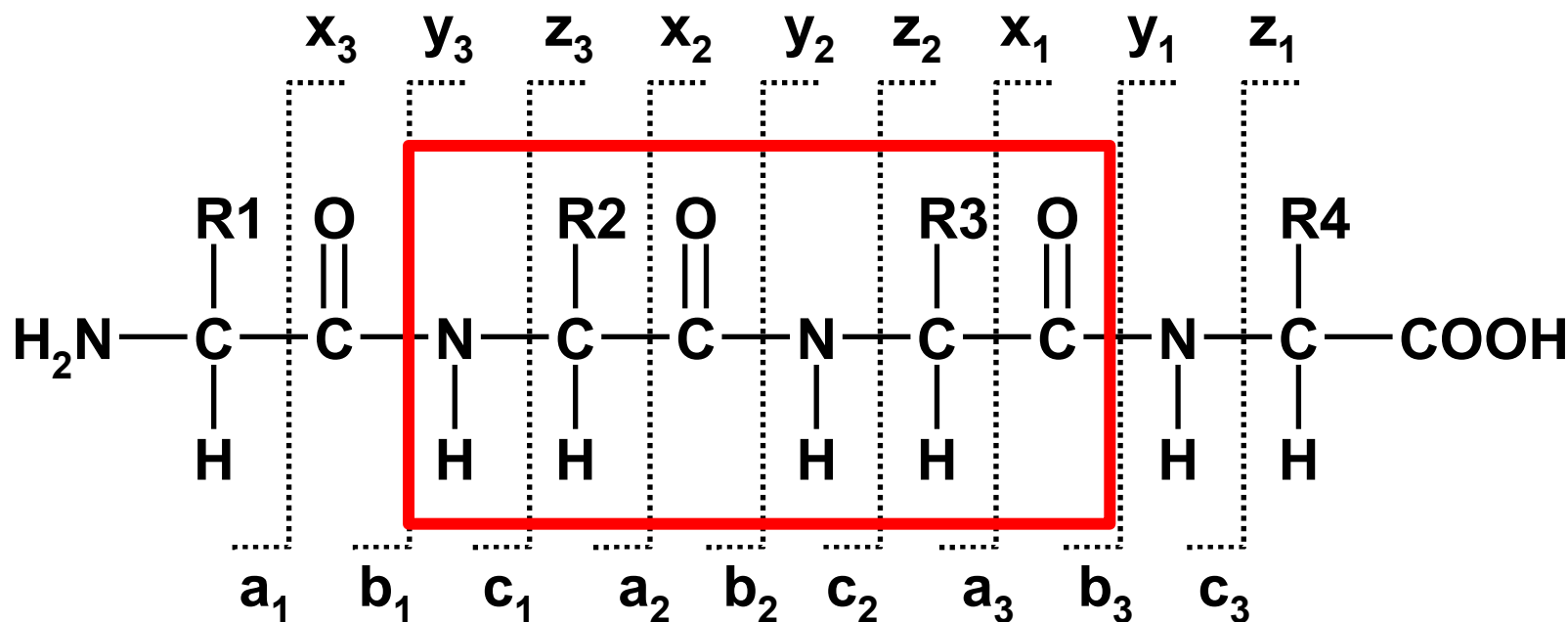
# Trojnásobný kvadrupól – MS/MS v prostoru



# Iontová past – $MS^n$ v čase



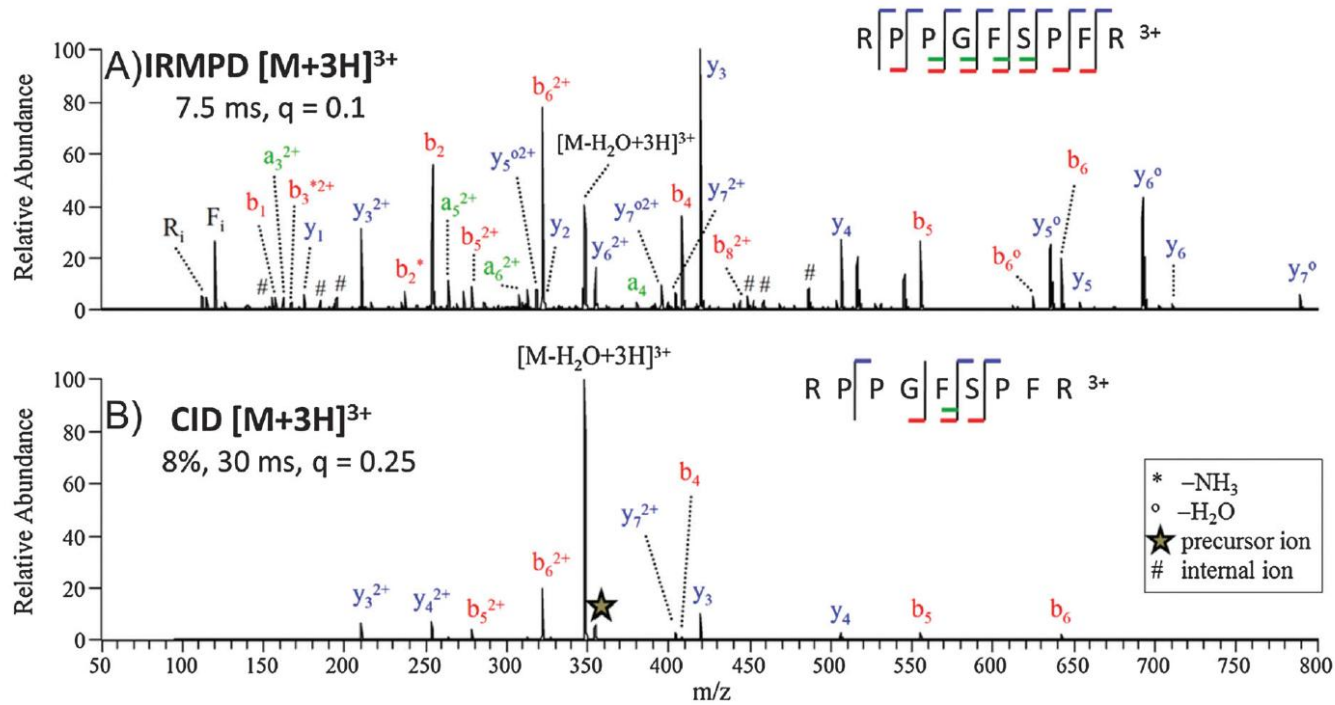
# Další typy fragmentací a fragmentových iontů



**Interní fragmenty (nemají N- ani C-konec)**

# Infrared Multiphoton Dissociation (IRMPD)

- CO<sub>2</sub> laserový paprsek
- Vibrační excitace funkčních skupin  
OH, COOH, NH<sub>2</sub>...
- Podobné CID - fragmentace peptidové páteře: *b*- a *y*-iontové série, ale extenzivnější fragmentace, přítomnost immoniových a *a*-iontů a fragmentů s nízkou *m/z*
- Lze jemně ladit energii laser a délku pulsu
- V případě FT-ICR výhoda oproti CID v ICR cele (není třeba napouštět kolizním plynem a tím narušovat vakuum)



# Electron Capture/Transfer Dissociation ECD/ETD(/EDD) = ExD

Záchyt elektronu ( $E \leq 0.1$  eV) - u peptidů preferenčně na  
S-S můstcích a vazbě  $N-C_\alpha$

Neutralizace  $H^+$ ;  $[M+2H]^+$  Vodíkem nabohacený radikálový iont. Štěpení vazby  $N-C_\alpha$

Vícenásobně nabité prekurzorové ionty

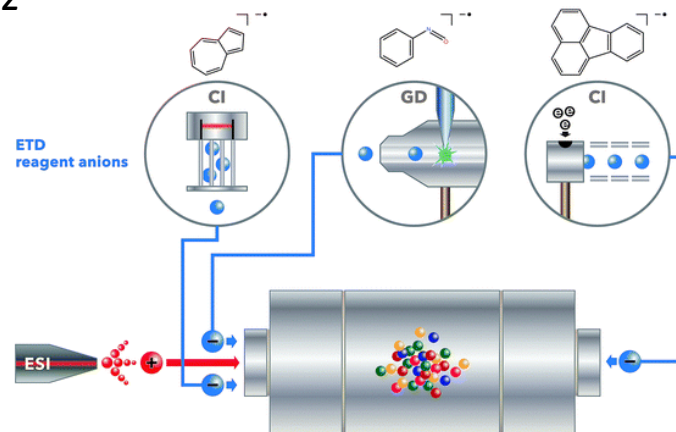
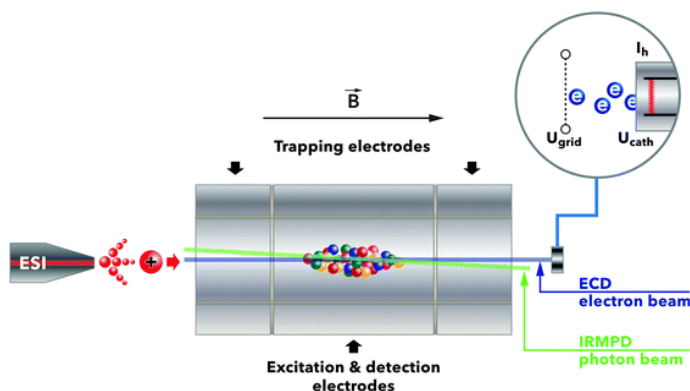
**c- a z-iontové série**

## Electron Transfer Dissociation (ETD)

ECD těžko aplikovatelné na analyzátoři s Rf polem (pasti, kvadrupóly)

Chemická ionizace = elektron přenáší anion (antracén, azobenzen, metan, fluoranthen...) -> neutralizace náboje a následně také fragmentace.

Vznik iontů c a z



# UltraViolet PhotoDissociation (UVPD)

UV lasery – Nd:YAG a excimer ArF, KrF,..

vlnové délky: 157nm, 193nm (peptidová vazba), 213nm, 266nm,...

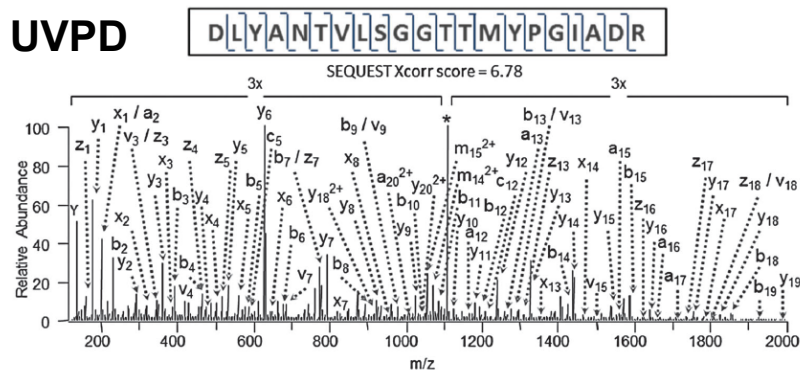
vlnové délky blízké 280nm – fragmentace u aromatických AK

obecně velmi rychlá fragmentace v řádu psec

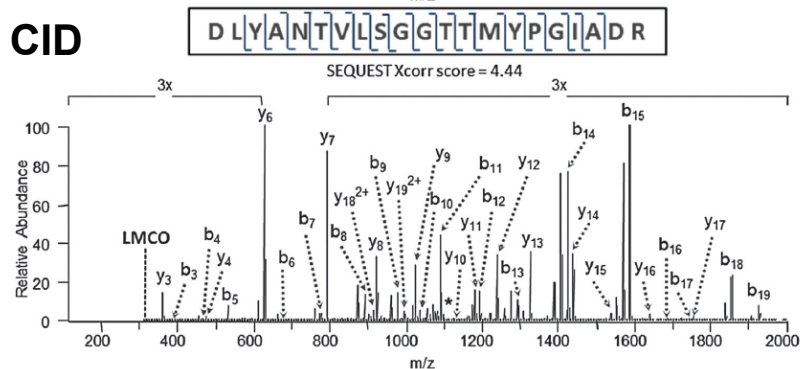
Výsledek podobný ExD, ale nedochází k redukci náboje – aplikovatelné i na 1+

a/x, c/z, ale i b/y ionty a také fragmentace bočních řetězců

## UVPD

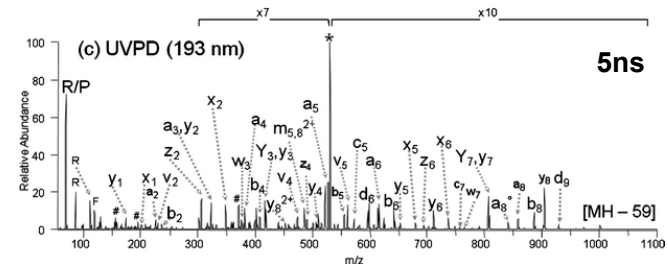
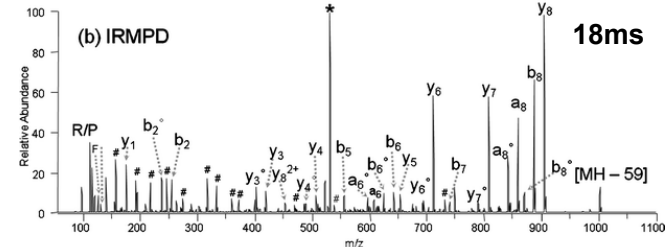
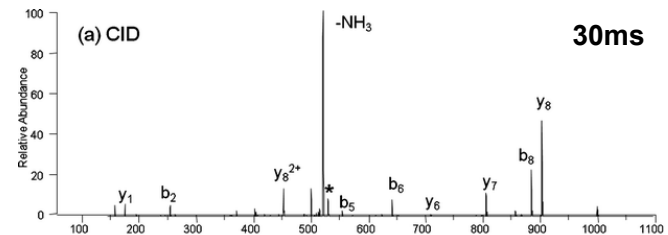


## CID



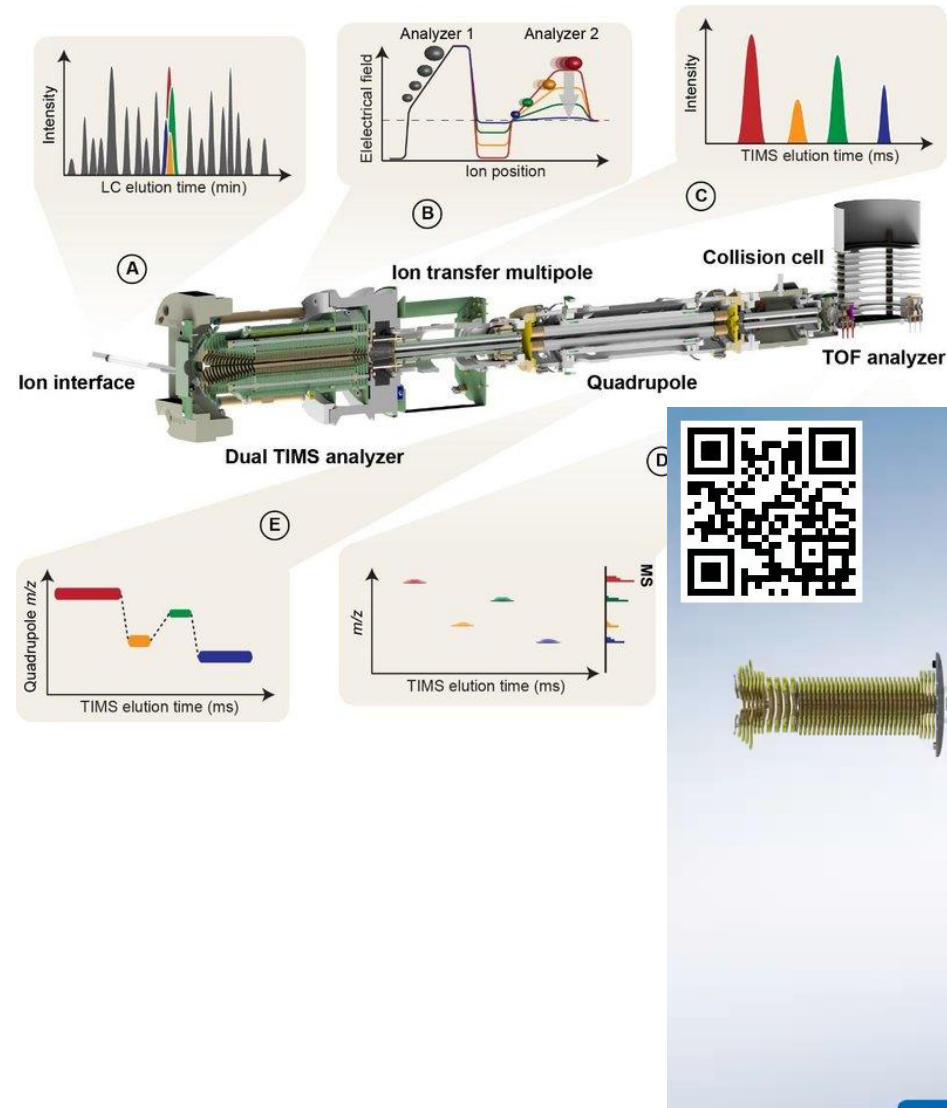
## RPPGFSPFR

(m/z 530.7)



# timsTOF

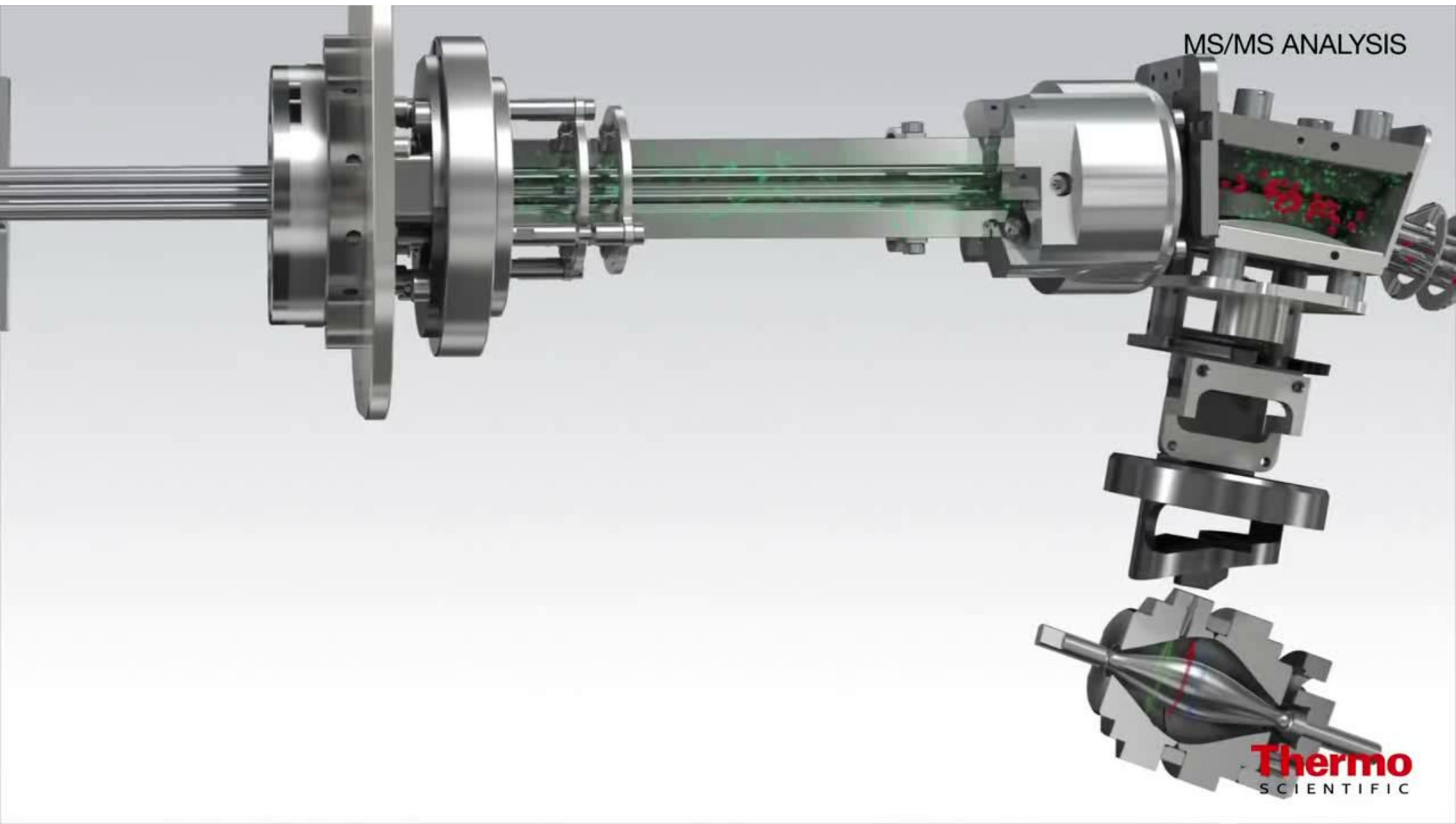
120Hz -> 300Hz



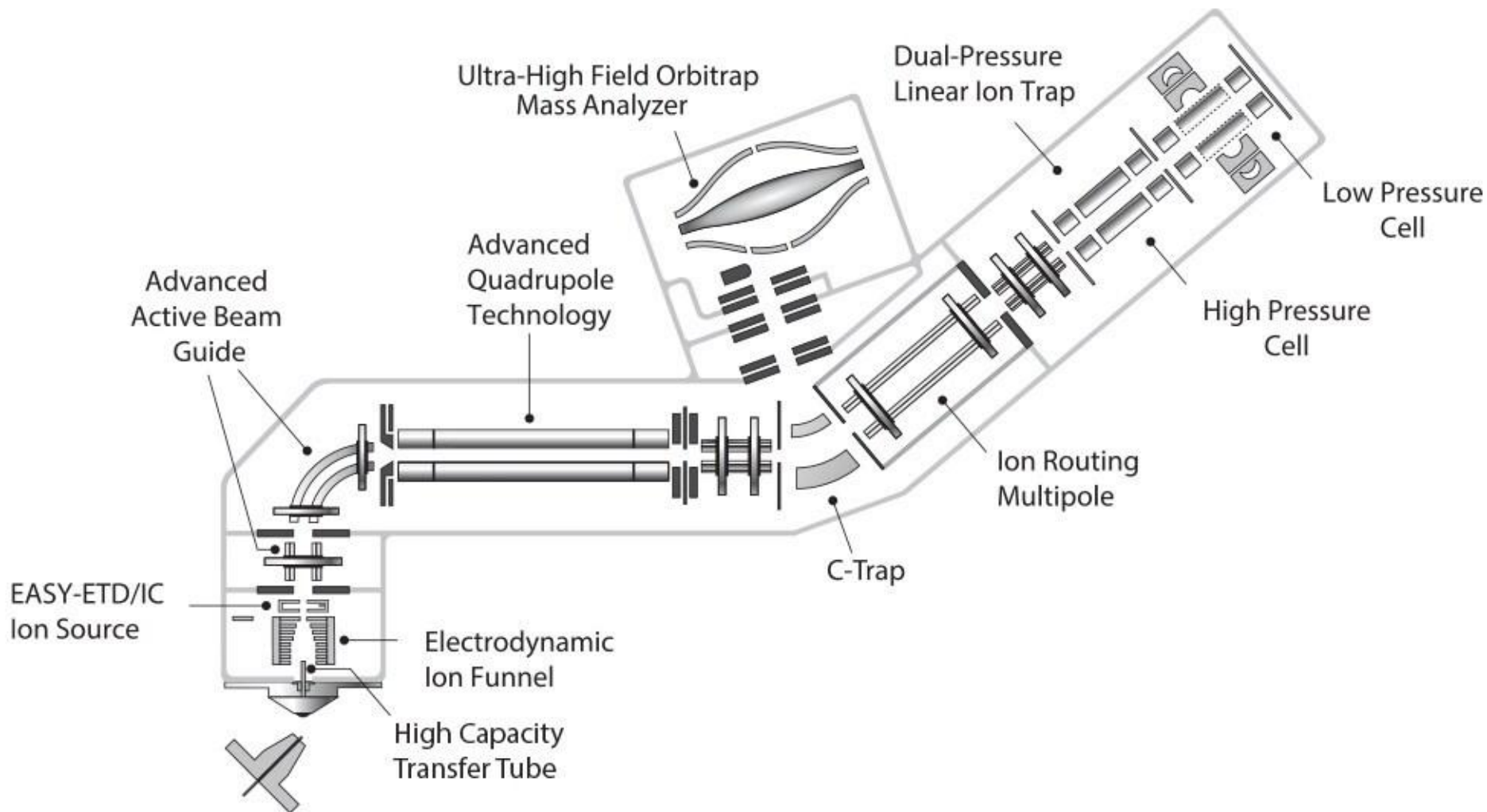
Iontová mobilita (2x tims) + qTOF

Akumulace (tims1), separace (tims2), (fragmentace q), analýza TOF

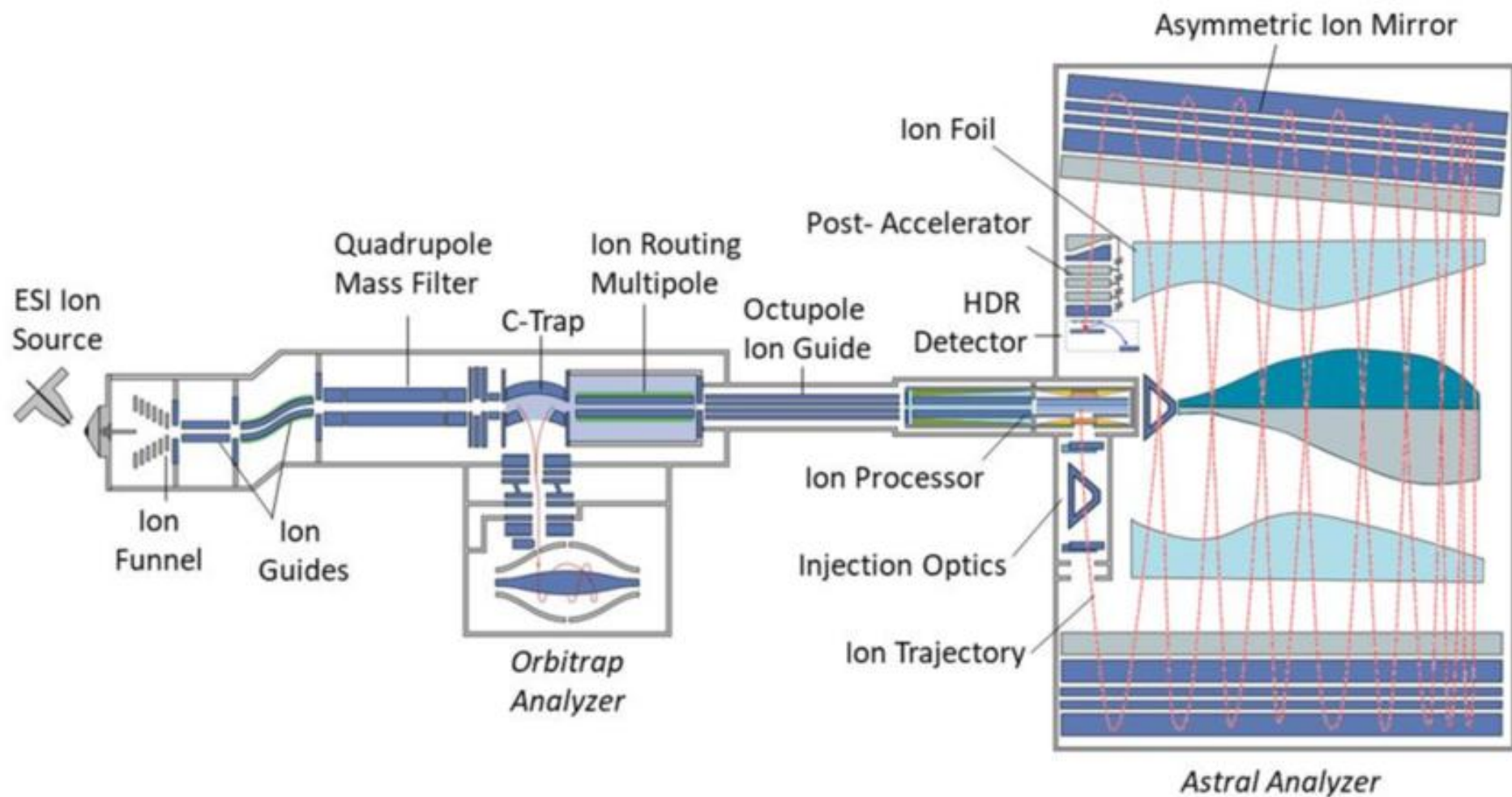
# Orbitrap – iontové pasti



# Orbitrap – iontové pasti



# Orbitrap ASTRAL



Sběr dat – 200Hz (200 spekter/s)